

Kritische Strukturveränderungen in Biofilmen und Biomembranen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des

Doktors der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

vorgelegt von

Michael Nagel

geboren am 01. Dezember 1987 in Wesel

Fachbereich Chemie der Universität Duisburg-Essen

Institut für Physikalische Chemie

Juli 2015

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2012 bis Juli 2015 im Fachgebiet der Physikalischen Chemie an der Universität Duisburg-Essen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. C. Mayer angefertigt.

Vorsitzender der Prüfungskommission:	Prof. Dr. rer. nat. Stephan Schulz
Referent:	Prof. Dr. rer. nat. Christian Mayer
Korreferent:	Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Herbert de Groot
Tag der mündlichen Prüfung:	12.11.2015

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versicher ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Kritische Strukturveränderungen in Biofilmen und Biomembranen“

nur mit den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verfasst und ohne fremde Hilfe angefertigt habe.

Ich erkläre, dass keine vorausgegangenen Promotionsverfahren in diesem oder einem anderen Fach endgültig gescheitert sind. Ich erkläre weiterhin, dass ich diese Dissertation nur in diesem Promotionsverfahren eingereicht habe.

Unterschrift: _____

Wesel, den 08.07.2015

Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. C. Mayer für die Möglichkeit in seinem Arbeitskreis meine Dissertation zu verfassen und für die Überlassung dieses interessanten Themas bedanken. Des Weiteren waren mir seine Begeisterung für die Thematik und die immerwährende Diskussionsbereitschaft eine echte Stütze.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. H. de Groot vom Institut für Physiologische Chemie bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferenten. Außerdem bedanke ich mich für die Kooperation mit der Physiologischen Chemie und deren fruchtbaren Boden, aus dem eine Publikation entstanden ist.

Ich bedanke mich bei Herrn Manfred Zähres für die hervorragende Zusammenarbeit bei NMR-Experimenten und in die Einweisung derer Auswertung. Ein weiterer Dank geht an Kirsten Schwark für die ausgesprochen nette Einweisung in die DSC und TGA. Weiterhin danke ich Saskia Dillmann, Jaqueline Uphoff und Silvia Lapsien für die Master- bzw. Bachelorarbeiten. Auch an Uwe Bachorwski geht ein Dank für die stetige Hilfsbereitschaft bei allen IT-Problemstellungen. Für die Simulationen der NMR-Spektren möchte ich mich herzlichst bei Franzeska Moegle-Hofacker von der Universität Stuttgart bedanken. Auch bei Prof. Dr. H-C. Flemming, Dr. Jost Wingender und Jan Frösler aus dem Arbeitskreis Flemming möchte ich mich in aller Höflichkeit bedanken für die hervorragende Arbeit und Hilfe bei der Probenvorbereitung mit *D. geothermalis*. Ein besonderer Dank gilt dem ganzen Arbeitskreis Mayer für die Hilfsbereitschaft und das sehr angenehme Arbeitsklima während meiner gesamten Promotion.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen lieben Freunden. Besonders den Veggie-War-, Freischaffenden-, Spießler- und Rippchen-Freunden danke ich für Ablenkung in der Freizeit nach stressigen Tagen. Ein großer Dank gilt auch meiner kompletten Familie mit meinen Schwiegereltern und meinen vier Großeltern. Allen voran möchte ich dabei meinen Eltern danken. Ohne Eure grenzenlose Unterstützung, Liebe und ihr Verständnis in den letzten Jahren hätte ich das Studium und diese Arbeit nicht geschafft. Auch meinem Bruder gilt ein ganz besonderer Dank. Auf dich kann man sich stets verlassen und einen besseren Bruder kann man sich nicht wünschen. Das ist *Ganz Großes Kino*! Meine Anna, Danke das du einfach du bist. Immer für mich da warst und bist und mich so liebst wie ich bin. Dein Rückhalt hat mich jeden Tag stark genug gemacht um all dies zu schaffen. Ich liebe dich!

„Die Natur ist so gemacht, dass sie verstanden werden kann. Oder vielleicht sollte ich richtiger umgekehrt sagen, unser Denken ist so gemacht, dass es die Natur verstehen kann.“

Werner Karl Heisenberg

Abstract

In this thesis two biological systems were analyzed for the influence of stress situation with different physical-chemical methods.

The polysaccharide alginate is used as a model system to analyze the effects of dehydrations on extracellular polymeric substances. The biofilm of the bacterium *Deinococcus geothermalis* is first dehydrates and then rehydrated afterwards. Using the pulsed-field gradient nuclear magnetic resonance (PFG-NMR) method showed that two types of water with different self-diffusion coefficients are present in the biofilm matrix. Elasticity measurements indicated the formation of a protective skin which is formed as a survival strategy of the dehydrated biofilm.

For a cell membrane the integration of a foreign molecule is an extreme situation. To study this, lipopolysaccharide (LPS) of the bacterium *Escherichia coli* is inserted into a membrane consisting of phospholipid DMPC. Through nanoindentation and solid-state NMR experiments it can be shown that integration of LPS disturbs the mechanical stability of the cell membrane.

biofilm, *Deinococcus geothermalis*, elasticity, pulsed field gradient NMR, lipopolysaccharide, nanoindentation

Zusammenfassung

In dieser Arbeit sind mit verschiedenen physikalisch-chemischen Methoden zwei biologische Systeme auf die Auswirkung von einer extremen Stresssituation untersucht worden.

Das Polysaccharid Alginat wird als Modellsystem, um die Auswirkungen einer Trockenperiode auf die extrazellulären polymeren Substanzen zu analysieren, eingeführt. Anschließend wird der Biofilm des Bakteriums *Deinococcus geothermalis* einer Trockenzeit ausgesetzt und anschließend wieder rehydratisiert. Mit der Methode der gepulsten-Feldgradienten Kernresonanzspektroskopie (PFG-NMR) kann beobachtet werden, dass in der Biofilm-Matrix zwei unterschiedliche Wasserarten mit verschiedenen Selbstdiffusionskoeffizienten vorhanden sind. Durch Elastizitätsmessungen wird die Ausbildung einer Schutzhaut verdeutlicht, die die Überlebensstrategie des Biofilms in einer Trockenperiode verdeutlicht.

Für eine Zellmembran ist die Integration eines Fremdmoleküls in die Doppelschicht eine extreme Stresssituation. In dieser Arbeit wird das Lipopolysaccharid (LPS) des Bakteriums *Escherichia coli* in eine Membran bestehend aus dem Phospholipid DMPC eingelagert. Mittels Nanoindentationsversuchen und Festkörper-NMR-Experimenten kann gezeigt werden, dass durch die Einlagerung des LPS die mechanische Stabilität der Zellmembran gestört wird.

Biofilme, *Deinococcus geothermalis*, Elastizität, gepulste-Feldgradienten NMR, Lipopolysaccharide, Nanoindentationsversuch

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Theoretische Grundlagen	3
2.1. Biofilm.....	3
2.2. Extrazelluläre polymere Substanzen	6
2.2.1. Polysaccharide	7
2.2.2. Alginat.....	9
2.3. Gele.....	14
2.4. <i>Deinococcus geothermalis</i>	15
2.5. Zellmembranen	17
2.5.1. Künstliche Modellmembran	19
2.6. Lipopolysaccharide	22
2.6.1. LPS von <i>Escherichia coli</i>	23
2.6.2. LPS von <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	25
3. Methoden	27
3.1. Thermische Analyse.....	27
3.1.1. Thermogravimetrische Analyse (TGA).....	28
3.1.2. Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)	30
3.2. UV/Vis Spektralphotometer	33
3.3. Rasterkraftmikroskopie (AFM)	35
3.4. Konfokale Raster Lasermikroskopie (CLSM)	41
3.5. Kernresonanzspektroskopie (NMR).....	44
3.5.1. Kernresonanzspektroskopie mit gepulsten Feldgradienten (PFG-NMR)	51
3.5.2. Festkörper-Kernresonanzspektroskopie	55
3.6. Dunkelfeldmikroskopie.....	59
3.7. Zeta-Potential-Messung	62
3.8. Theoretische Berechnung von NMR-Festkörper-Spektren	66
4. Praktische Durchführung.....	68
4.1. Acetylierung von Algenalginat.....	68
4.2. Probenpräparation von Alginatgelen zur Analyse mittels UV/Vis-Spektroskopie	69
4.3. Probenpräparation von Alginatgelen zur Analyse mittels PFG-NMR.....	69
4.4. Kultivierung von <i>D. geothermalis</i> auf R2A.....	70
4.5. Probenpräparation von <i>D. geothermalis</i> zur Analyse mittels TGA	72

Inhaltsverzeichnis

4.6. Probenpräparation von <i>D. geothermalis</i> zur Analyse mittels DSC	72
4.7. Trocknung von <i>D. geothermalis</i> in der Trockenkammer	73
4.8. Rehydratisierung von <i>D. geothermalis</i>	74
4.9. Probenpräparation von <i>D. geothermalis</i> zur Analyse mittels CLSM.....	75
4.10. Analyse mittels AFM	76
4.10.1. Probenpräparation von <i>D. geothermalis</i>	76
4.10.2. Probenpräparation von menschlichen Erythrozyten mit bakteriellen Endotoxinen zur Analyse mittels AFM	77
4.11. Synthese der multilamellaren Vesikel aus DMPC	77
4.13. Messung des Selbstdiffusionskoeffizienten des Lipopolysaccharides.....	79
4.14. Probenpräparation der DMPC-MLVs zur Analyse mittels AFM	79
4.15. Zeta-Potential-Messung	79
4.16. Darstellung der DMPC-Doppelschicht mit und ohne LPS	80
4.17. Festkörper-NMR von DMPC-Doppelschichten	80
4.18. Verwendete Chemikalien.....	82
5. Ergebnisse und Diskussion	83
5.1. Biophysikalische Systeme unter Stressbedingungen.....	83
5.2. Wasserspeicherung in der EPS und im Biofilm	83
5.2.1. Algenalginatgele	83
5.2.1.1. Acetylierung von Algenalginatgelen	83
5.2.1.2. Wasserspeicherung in Alginatgelen.....	86
5.2.2. Wasserspeicherung im Biofilm von <i>D. geothermalis</i>	91
5.2.2.1. Trocknungsversuche an Biofilmen von <i>D. geothermalis</i>	91
5.2.2.2. Rehydratisierung von getrockneten Biofilmen.....	101
5.3. Einfluss von bakteriellen Endotoxinen auf Zellmembranen	119
5.3.1. Einfluss von bakteriellen Endotoxinen auf die strukturelle Integrität von humanen Erythrozyten.....	119
5.3.2. Einfluss von bakteriellen Endotoxinen auf die strukturelle Integrität von DMPC- multilamellaren Vesikeln	123
5.3.3. Einfluss auf die strukturelle Integrität von künstlichen Zellmembranen durch bakterielle Endotoxine	137
6. Zusammenfassung und Ausblick.....	143
7. Literaturverzeichnis.....	146
8. Anhang.....	157
Abkürzungs- und Symbolverzeichnis	169
Lebenslauf	174

1. Einleitung

Das Leben unter extremen Umweltbedingungen mit hohen Temperaturen oder in wässrigen Milieus mit starkem Säuregehalt scheint für uns Menschen nicht vorstellbar zu sein. Dennoch gibt es Bakterien, die sich im Laufe der Evolution an solche Einflüsse angepasst haben. Diese Mikroben werden Extremophile genannt. [1] Durch Bakterien, die in großer Hitze leben, können wir lernen, wie sich das Leben auf der Erde vor Millionen von Jahren aus heißen Quellen heraus entwickelt haben könnte. [2] Bakterien leben in mikrobiellen Lebensgemeinschaften wie Mikrokolonien oder Schlämmen, welche auf der Erde nahezu ubiquitär sind. Allgemein hin werden solche Systeme unter dem Begriff des Biofilms zusammengefasst. Bakterielle Lebensgemeinschaften entstehen, wenn sich beispielsweise Bakterien, die Biofilme bilden, an Grenzflächen ansiedeln, um dort zu größeren Bakterienkolonien heranzuwachsen. [3]

Bis zu 95% der Masse eines Biofilms besteht aus sogenannten Extrazellulären Polymeren Substanzen (EPS). Diese Biopolymere werden weitergehend in Polysaccharide, Proteine und Nukleinsäuren unterteilt. [4] Die Polysaccharide, die den Hauptteil der EPS ausmachen, stellen das Grundgerüst des Biofilms dar. Aufgrund ihrer Eigenschaft, Schwermetalle wie Cd^{2+} -Ionen zu binden, ist es möglich, die Qualität vom Trinkwasser zu verbessern. Somit können sie nicht mehr über das Wasser in unsere Nahrungskette gelangen. [5] Des Weiteren können nicht nur Schwermetalle durch die Polysaccharide gebunden werden, sondern auch große Mengen Wasser. Mit diesem Mechanismus versuchen die Mikrokolonien sich vor einer Austrocknung zu schützen. [6] Der Aspekt der Wasserspeicherung und dem damit verbundenen Schutz vor Austrocknung über einen längeren Zeitraum ist ein interessanter Ansatz bei der Suche auf eine Antwort, ob Leben außerhalb dieses Planeten Erde möglich ist. [7]

1. Einleitung

Im Speziellen wird ein bakteriell produzierter Biofilm von dem Bakterium *Deinococcus geothermalis* untersucht. Die Charakterisierung der Wasserspeicherfähigkeiten und die Unterscheidung von verschiedenen in der Biofilmmatrix gebundenen Wassersorten sind die Kernziele dieser Arbeit. Als Modellsystem und zur Absteckung der Parameter wird mit dem Polysaccharid Alginat der Braunalge *Phaeophyceae* gearbeitet. Durch die Untersuchung der Wasserspeicherfähigkeit von Biofilmen können Aussagen darüber getroffen werden, wie diese Lebensgemeinschaften mit der Stresssituation der Trockenheit umgehen.

Für andere biologische Systeme wie den Biomembranen bedeutet eine Stresssituation die Einlagerung von Fremdmolekülen in die Doppelschicht der Membran. Solch ein Fremdmolekül ist beispielsweise ein bakterielles Lipopolysaccharid (LPS). Diese Biopolymere bestehen aus einem hydrophoben Teil, der hauptsächlich durch aliphatische Bestandteile gekennzeichnet ist, und aus einem hydrophilen Bereich, der aus einer Reihe unterschiedlicher Zuckermoleküle besteht. [8] Das LPS kann von den Bakterien freigesetzt werden, sobald die Bakterien absterben. Sollten LPS-Moleküle in die menschliche Blutbahn gelangen, wirken sie toxisch, weshalb die Lipopolysaccharide zu der Gruppe der Endotoxine zählen. Das LPS interagiert mit einem Rezeptor, der sich auf der Oberfläche der roten Blutkörperchen befindet. Dabei wird eine intrazelluläre Signal-Kaskade ausgelöst. [9] Die Erkenntnisse über die Auswirkungen der Endotoxine auf die Zellmembran der Erythrozyten sind noch nicht weitreichend, wie das Verständnis der Wechselwirkung der Lipopolysaccharide mit den Rezeptoren auf der Oberfläche von roten Blutkörperchen.

In der vorliegenden Arbeit soll aufgeklärt werden, inwiefern LPS-Moleküle von dem Bakterium *Escherichia coli* die Zellmembran von menschlichen roten Blutkörperchen den sogenannten Erythrozyten schwächt. Im Zuge dessen werden die Elastizität und die Ordnungsparameter innerhalb der Zellmembran bestimmt.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Biofilm

Der Begriff des Biofilms kennzeichnet eine Kolonie von Bakterien. Ein Biofilm ist für sich genommen ein kleines Ökosystem, welches durch äußere chemische, physikalische oder biologische Einflüsse bestimmt wird. Diese Wechselwirkungen des Biofilms mit der Umwelt und den Mikroorganismen untereinander haben sich im Laufe der Evolution entwickelt. [10] Ein Vorteil für die Mikroorganismen in der Biofilmmatrix ist, dass sie gegen äußere Einflüsse geschützt sind. Durch den hohen Wassergehalt im Inneren des Systems können Bakterien in einer (äußeren) Trockenperiode überleben. [11]

Trotz ihres hydrophilen Charakters können Biofilme auch auf hydrophoben Untergründen adsorbieren. Diese Theorie wurde von COSTERTON 1987 [12] detailliert ausgeführt. Sein Vorgang zur Anbindung von Biofilmen auf einer festen Oberfläche wird durch vier Stufen beschrieben:

1. Die Verknüpfung eines Bakteriums mit dem Substrat erfolgt reversibel oder irreversibel.
2. Das Bakterium beginnt sich zu teilen und somit sich zu vermehren.
3. Es bildet sich eine Kolonie aus, die ab jetzt Biofilm genannt wird.
4. Anlagerung anderer Bakterien aus der Bulkflüssigkeitsschicht (siehe Abbildung 1) an die Mikrokolonie.

2. Theoretische Grundlagen

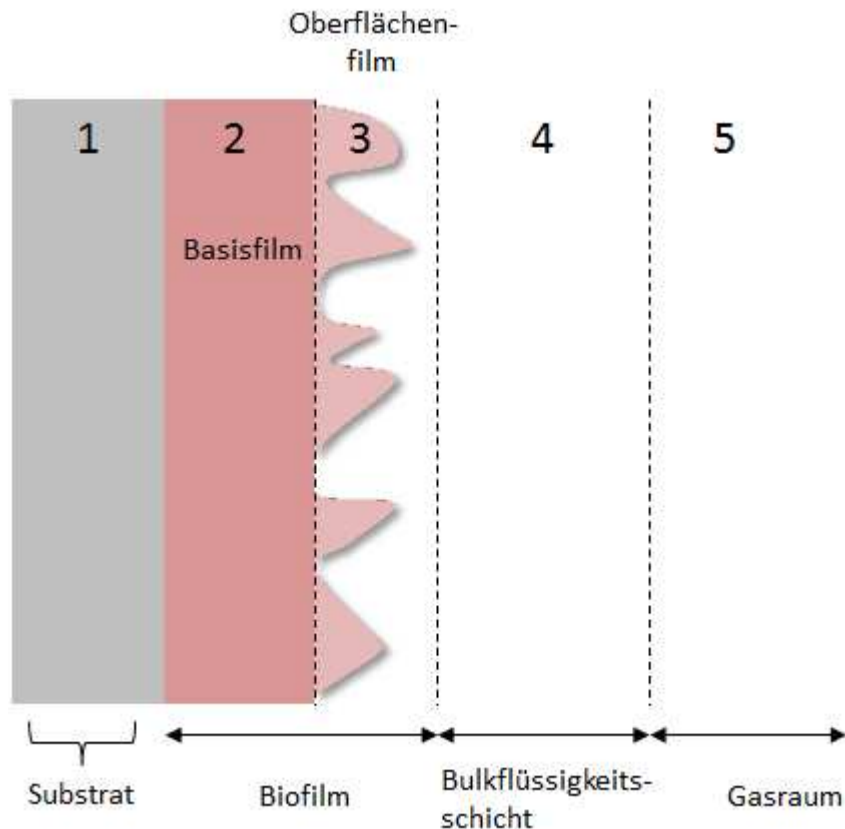


Abbildung 1: Illustration der fünf Hauptteile eines Biofilm-Systems: (1) Substrat, (2) Basisfilm des Biofilms, (3) Oberflächenfilm, (4) Bulkflüssigkeitsschicht und (5) das umgebende Gas.

Ein komplettes Biofilm-System besteht aus fünf Hauptteilen. Dabei ist der Gas/Flüssigkeits-Bereich (4 und 5 in Abbildung 1) ebenfalls ein Teil des Biofilms, genauso wie die darunterliegende Biofilmmatrix (2 und 3), die auf dem Substrat (1) verankert ist. Die angelagerte Biofilm-Schicht kann sich zwischen einer Monolage an Zellen und einer Dicke von 300-400 nm bewegen. [13,14] Die innere Struktur des Biofilms ist höchst heterogen. Diese Inhomogenität des Basisfilms (2 in Abbildung 1) ist durch die enthaltenen Wasserkanäle, Röhren und länglichen Tunneln gegeben. [15]

Bakterielle Biofilme kommen in der Natur und in der Industrie vor. Für die Medizin und die chemische Industrie sind Biofilmprozesse auf semipermeablen Membranen von besonderer Bedeutung. In der Industrie muss hierbei zwischen gewolltem und nicht gewolltem Biofilmwachstum unterschieden werden.

Einer der besonderen Eigenschaften der Biofilme ist, dass sie Metalle und damit auch Schwermetalle komplexieren können. Diese Lebensgemeinschaften sind damit in der Lage, Abwässer in industriellen Anlagen von giftigen Schwermetallen zu befreien, womit diese einfacher und kostengünstiger entsorgt werden können. Bei diesem Verfahren kommen Technologien, wie der Membranreaktor zum Einsatz. [16] Nachteilig sind Biofilme in der Industrie, wo sie als ungewollte Ablagerungen auftreten können. Bei einem Wärmetauscher beispielsweise hängt die Effektivität von der zur Verfügung stehenden Oberfläche ab. Wird die nutzbare Oberfläche durch eine Biofilmbewachung kleiner, sinkt gleichzeitig der Wirkungsgrad des Wärmetauschers. Dieser Prozess wird Biofouling genannt. [17]

2. Theoretische Grundlagen

2.2. Extrazelluläre polymere Substanzen

Der Begriff der extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) umfasst eine große Anzahl an verschiedenen extrazellulären Makromolekülen. Unter anderem gehören Polysaccharide, Proteine, Lipide und Nukleinsäuren in absteigender Reihenfolge der Häufigkeit zu diesen Molekülen. [18] Die enthaltenen Polysaccharide können in zwei Untergruppen unterteilt werden, wobei es Unterschiede in der Kettenlänge und dem Grad der Verzweigung gibt. [19] Zum einen gibt es die spezifischen EPS, die, wie ihr Name bereits sagt, eine für jedes Bakterium spezifische Zusammensetzung besitzen. [20] Die andere, zweite Untergruppe der EPS sind die unspezifischen Polymere. Sie werden durch ihre einfache Struktur gekennzeichnet und sind meist durch simple Homopolysaccharide aufgebaut. Ein Beispiel dafür ist das in dieser Arbeit verwendete Alginat. [21]

Polysaccharide neigen zur Bildung einer Matrix. Insbesondere in Gegenwart von mehrwertigen Kationen, die aus dem Wasser aufgenommen werden, sind die Polysaccharide innerhalb des Biofilms ein struktursichernder Baustein. [22] Mit dieser Möglichkeit zur Gelierung, durch Ausbildung eines großen Netzwerkes, kann der Biofilm große Mengen an Wasser speichern. Dies ist nötig, um die Bakterien vor dem Austrocknen zu schützen. Somit stellen auch auf den ersten Blick lebensfeindliche Umgebungen, wie die Wüste oder heiße Quellen, kein Problem für diese Mikroben dar. [23]

Aufgrund von oberflächenaktiven Eigenschaften haben die extrazellulären polymeren Substanzen eine wichtige Bedeutung für die Industrielle Chemie. Bei dem Einsatz in der Mineralölförderung werden EPS verwendet, um oberflächengebundenes Öl besser zu lösen. [24–26]

2.2.1. Polysaccharide

Polysaccharide, die von Mikroorganismen gebildet wurden, werden mikrobielle Polysaccharide genannt. Meist sind es hochpolymere Kohlenhydrate, d.h. Makromoleküle, die die allgemeine Summenformel $C_nH_{2n}O_n$ besitzen. Polysaccharide sind Polymere, die sich aus Monosacchariden zusammensetzen. Diese bilden in Lösungen cyclische Halbacetalformen aus. Es entstehen fünf- oder sechsgliedrige Strukturen. [27] In Abbildung 2 sind die Monosaccharide dargestellt, die die häufigsten Bausteine der Polysaccharide stellen. Hierbei handelt es sich um verschiedene Pentosen, Hexosen und Uronsäuren.

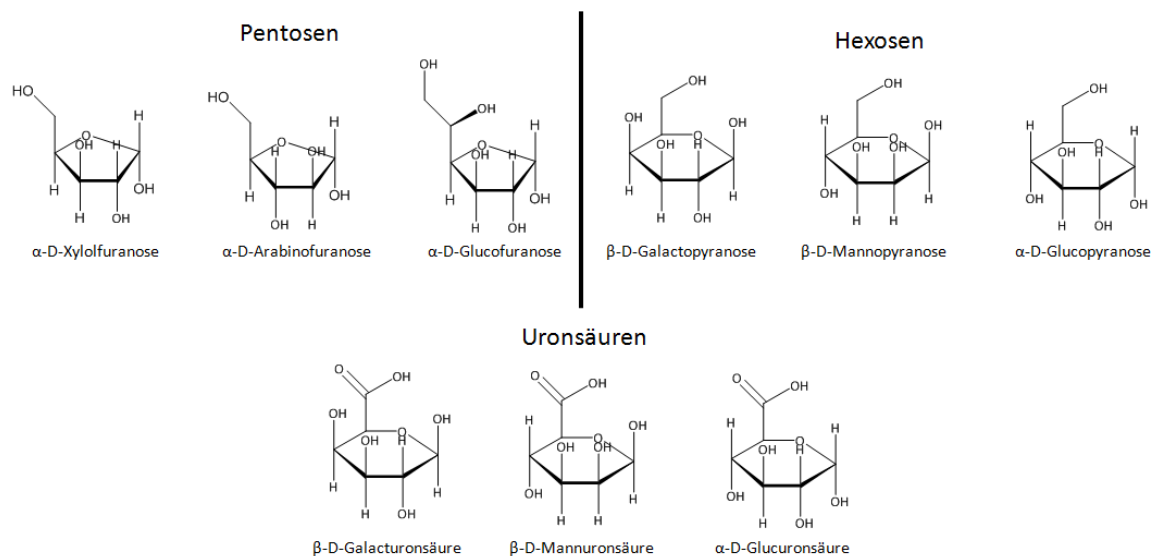


Abbildung 2: Darstellung der häufigsten Monosaccharid-Bausteine der Polysaccharide.

Die Verknüpfung zwischen den einzelnen Monosacchariden besteht aus einer glykosidischen Bindung, weshalb die Polysaccharide auch Glycane genannt werden. [28] Bei den Polysacchariden wird zwischen Homo- und Heteropolysacchariden unterschieden. Sogenannte Homopolysaccharide sind lediglich aus einem einzigen, sich wiederholenden Monosaccharid aufgebaut, wohingegen Heteropolysaccharide aus zwei oder mehr Monosaccharid-Typen bestehen. Eine weitere Art der Unterscheidung ist die

2. Theoretische Grundlagen

Form des Polymers. Es gibt Makromoleküle, die eine lineare Form aufweisen und andere, die mehr oder weniger zahlreiche Verzweigungen aufweisen. [29]

Ein Indiz für die Stabilität eines Polysaccharides ist die Position der glycosidischen Bindungen innerhalb eines Polymers. Lineare Kohlenhydratpolymere sind durch β -glycosidische Bindungen gekennzeichnet und besitzen meist eine höhere thermische Stabilität als die Kohlenhydrate, die mit α -glycosidische Bindungen verknüpft sind. [30]

Ein Beispiel für ein Polysaccharid ist das Alginat, welches in Abbildung 3 mit den Hauptblöcken β -D-Mannuronat (M) und α -L-Guluronat (G) dargestellt ist. Dieses Polysaccharid ist ein sogenannter Polyelektrolyt. Polyelektrolyte sind Polymere, die in ihrer Haupt- bzw. Seitenkette ionische Gruppen aufweisen. Des Weiteren können sie anstelle der schon vorhandenen ionischen Gruppen auch solche funktionellen Gruppen besitzen, die leicht ionisiert werden können. Es werden dabei zwei Klassen von Polyelektrolyten unterschieden: Zum einen die Polyanionen, zu denen auch das Alginat zählt (Abbildung 3), und zum anderen die Polykationen. [31]

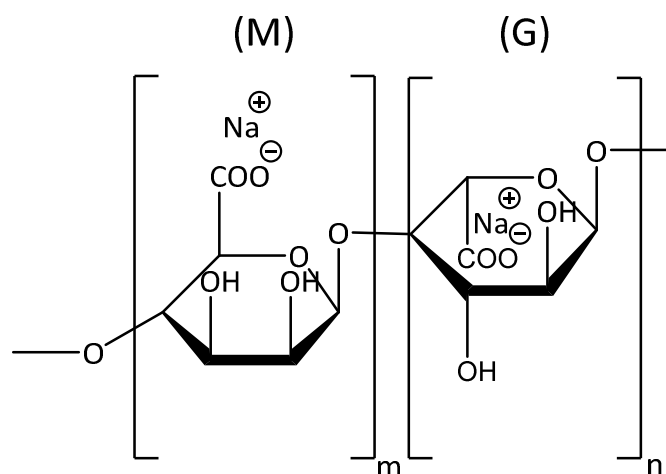


Abbildung 3: Molekulare Darstellung des Natriumsalz des Alginats als Polyelektrolyt bzw. Polyanion. Rechts ist das α -L-Guluronat (G) und links das β -D-Mannuronat (M) zu erkennen.

In biologischen Systemen ist die Verbreitung von Polysacchariden ubiquitär. Durch die unterschiedlichen strukturellen Formen sind zahlreiche biologische Funktionen denkbar. Bei Landpflanzen und diversen Mikroorganismen haben die Polysaccharide

innerhalb der Zellwand eine stützende Funktion. [32] Gebildet werden die biologischen Makromoleküle in dem Cytoplasma der Zelle. Gespeichert werden die Polysaccharide zum Beispiel in den Plastiden, wo meistens Stärke eingelagert wird. In anderen pflanzlichen Zellen werden Reservepolysaccharide in sogenannten Vakuolen abgelagert, um Wasser zu binden. Diese aufquellbaren Polysaccharide dienen zum Schutz vor Austrocknung der Zelle. [33]

Die Synthese von biologischen Kohlenhydratpolymeren unterliegt keinem bekannten Kontrollmechanismus. Es ist auch nicht nachgewiesen, wie die jeweiligen Monosaccharide für den Aufbau ausgewählt werden. Eine genetische Steuerung der Synthese, wie es bei Proteinen der Fall ist, konnte noch nicht entdeckt werden. Dennoch muss es einen geregelten Mechanismus für den Aufbau der Polysaccharide geben, da diese Polymere einen immer wiederkehrenden speziellen Kettenabschnitt mit einem bestimmten Polymerisierungsgrad besitzen. [30]

2.2.2. Alginat

Alginat ist ein Polysaccharid, welches von Algen, im Besonderen von den Braunalgen, synthetisiert wird. [34] Unter dem Begriff Alge werden eine Vielzahl von eukaryotischen Lebewesen, die Photosynthese betreiben aber nicht zu den Pflanzen zählen, zusammengefasst. Dennoch besitzen alle Spezies zwei hauptsächliche Eigenschaften, die sie verbinden. Einerseits besitzen alle diese Organismen den Chelatkomplex Chlorophyll und andererseits ist die Fortpflanzung der Algen auf das Verstreuen von Sporen beschränkt. Durch das Chlorophyll leben die meisten Algenarten von der Photosynthese. Andere Arten jedoch verbinden sich mit Wasserlebewesen in einer symbiotischen Lebensgemeinschaft.

Es gibt nur wenige Ausnahmen an Algen, die nicht aquatisch, sondern terrestrisch, bzw. sogar unterirdisch leben. [35,36] Da einige Arten der Braunalge in der Gezeitenzone wachsen, sind sie regelmäßig der Ebbe ausgesetzt. Damit sie in der Zeit

2. Theoretische Grundlagen

ohne Wasser nicht austrocknen, übernimmt die in ihren Zellwänden enthaltene Alginat die Funktion des Wasserspeichers. Sie ist in der Lage, eine große Menge Wasser zu binden und wird zu einer stark viskosen gelartigen Flüssigkeit. Somit speichert die Alge Wasser über einen längeren Zeitraum und schützt sich vor der Austrocknung. [37] Die Braunalgenart *Phaeophyta* ist eine marine Algengattung und gehört zu der Familie der Chromista. [38] Sie ist eine Braunalgenart, die Alginat für den strukturellen Aufbau ihrer Zellen synthetisiert. Die Braunalge betreibt Photosynthese durch das in ihren Zellen enthaltene Chlorophyll. Anders jedoch als die Grünalgen produziert die Braunalge keine Stärke durch die Photosynthese, sondern Laminarin und Mannitol. Ihre braune Färbung erhält die Braunalge durch den Farbstoff Fucoxanthin. [35] Die Fortpflanzung der Braunalgen geschieht in der Regel durch Generationswechsel. Eine Fortpflanzungsart wird dann Generationswechsel genannt, wenn die geschlechtlichen und ungeschlechtlichen Fortpflanzungsarten von Generation zu Generation wechseln. Die ungeschlechtliche Fortpflanzung dient dazu eine sehr große Menge an Nachkommen zu erzeugen, wohingegen die geschlechtliche Variante für die Durchmischung des Genpools sorgt. [39]

Das Polysaccharid Alginat kann auch von Bakterien gebildet werden. Eine der bekanntesten Formen des mikrobiellen Alginats ist das des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa*. Die Alginate, die von Bakterien gebildet werden, unterscheiden sich von denen, die von Algen produziert werden, durch ihre zusätzlichen O-Acetylgruppen. Diese Gruppen bewirken eine Schwächung des Netzwerkes, welches bei der Bindung mehrwertiger Kationen entsteht. Außerdem besitzen bakterielle Alginate keine α -L-Guluronat-Blöcke. [40] Die Alginate sind unverzweigte Heteropolymere, welche aus den Bausteinen β -D-Mannuronat (M) und α -L-Guluronat (G) bestehen. Beide Monosaccharide in Abbildung 4 gehören zu der Klasse der Uronsäuren. [41]

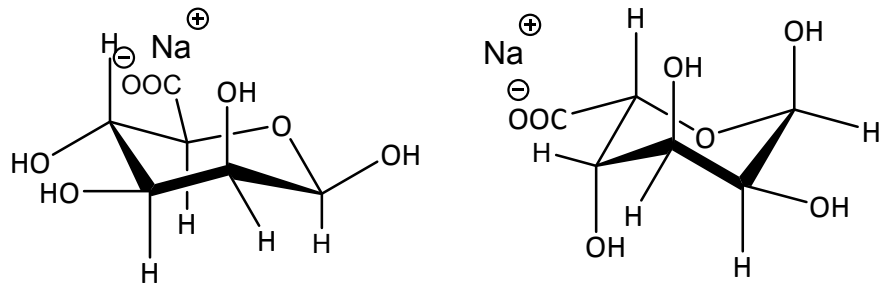


Abbildung 4: Monomereinheiten des Alginats, β -D-Mannuronat (M) (links), α -L-Guluronat (G) (rechts).

Über 1,4-glykosidische Bindungen sind die Monosaccharide miteinander verbunden. In der flüssigen Phase kann es bei einem Austausch des einwertigen Gegenkations gegen ein mehrwertiges Metallkation zu starken Wechselwirkungen zwischen dem Polymer und dem „neuen“ Kation kommen. Es wird von einer Vernetzung gesprochen. [42] Aufgrund des Austausches der Kationen kommt es zu einem Konformationswechsel bei dem Glycan Alginat. Die durch den Konformationswechsel entstandene Struktur des Polyelektrolyts ähnelt dann dem eines Eierkartons (engl. *Egg-Box*). [43] Diese Wechselwirkung und die damit verbundene Änderung der Molekülstruktur ist in Abbildung 5 am Beispiel von Alginat mit Mg^{2+} -Ionen als mehrwertige Gegenkationen schematisch dargestellt.

2. Theoretische Grundlagen

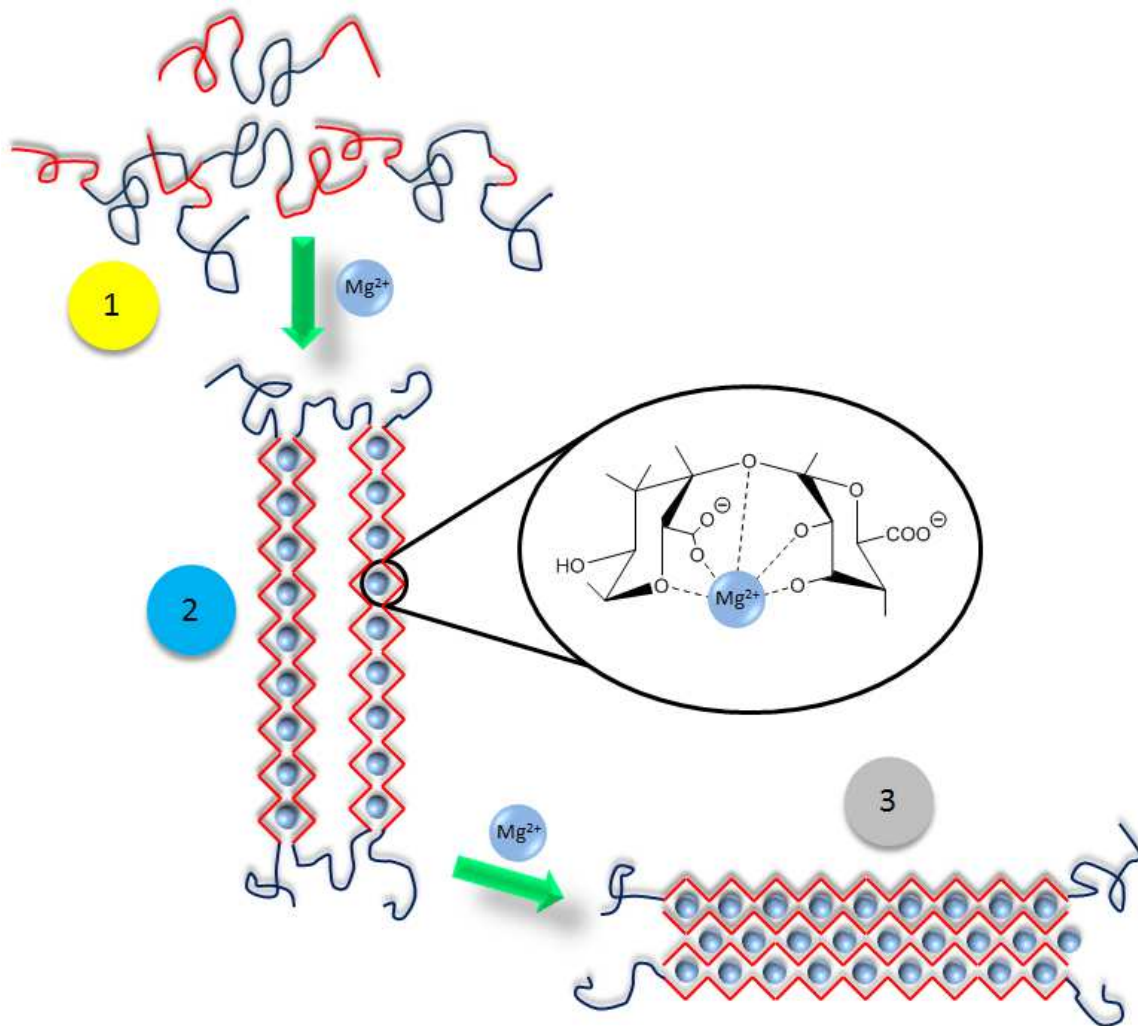


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Entstehung der Egg-Boxen für Alginat mit Mg^{2+} als Gegenkation; blaue Kettenbestandteile: Mannuronat, rote Kettenbestandteile: Guluronat. Die Magnesiumionen binden (1) sich zwischen die Alginatketten, sodass eine Dimerisierung stattfindet (2). Bei weiterer Magnesiumzugabe können Multimere entstehen (3). [44]

In Schritt 1 der Abbildung 5 findet eine Entladung des Alginatmoleküls statt, wobei Monokomplexe an bestimmten Bindungsstellen geknüpft werden. Das Metallkation geht eine Bindung mit den Carboxylatgruppen des Alginates ein. [45] Unter Schritt 2 ist die Dimerisierung aufgrund der Anbindung der Magnesiumionen zu erkennen. Das Polysaccharid Alginat bindet die Magnesiumionen oder andere mehrwertige Metallkationen. Bei der Zugabe von zweiwertigen Metallkationen sinkt zunächst die Viskosität der Lösung. Anschließend kommt es zu einem Konformationswechsel des Polysaccharides, was mit einer Gelierung einhergeht. Dadurch steigt die Viskosität der

Lösung an. Bei langkettigen Alginaten werden danach Multimere gebildet, die in der Lösung ausflocken (Schritt 3 in Abbildung 5). [46]

Alginat werden in vielen Bereichen des Alltags eingesetzt. Aufgrund ihrer Fähigkeit zu gelieren werden sie in der Lebensmittelindustrie (Mayonnaise oder Speiseeis), in Körperpflegemitteln oder auch Cremes häufig als Bindemittel genutzt. In der Medizin werden Alginat als abbaubare Fäden zur Verschließung von Wunden im Körper verwendet. [28]

2. Theoretische Grundlagen

2.3. Gele

Der Begriff Gel deckt einen großen Bereich von Systemen ab, die eine übergeordnete kontinuierliche Struktur ausbilden. Dabei findet nach P. J. FLORY eine Klassifizierung in vier Untergruppen statt. [47]

1. Geordnete lamellare Strukturen, die eine Gelmesophase enthalten.
2. Ungeordnete Netzwerke (kovalent), die aus Polymeren bestehen.
3. Polymernetzwerke, die aufgrund von physikalischer Aggregation entstanden sind und in ungeordneter Form, mit lokal geordneten Strukturen vorliegen.
4. Netzwerk bestehend aus kleinen Partikeln, die sich in ungeordneter Form gegliedert haben.

Alginate bilden ein Gel der dritten Untergruppe aus. Die Biopolymere in dem Gelnetzwerk werden durch inter- und intramolekulare Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen, miteinander verbunden. Bei der Erhöhung der Polymerkonzentration innerhalb des Gels treten Verschlaufungen zwischen den benachbarten Makromolekülen auf. Dadurch entstehen Zwischenräume und Röhren, in denen sich Wasser einlagern und hindurch diffundieren kann. [48]

Eine Erhöhung der Vernetzung innerhalb des Gels hemmt die Diffusion des Wassers durch das System. Dadurch wird eine Art „Transport-Barriere“ [19] aufgebaut, die sich nicht nur auf Wassermoleküle sondern auch auf die in dem Wasser gelösten Stoffe bezieht. [49]

2.4. *Deinococcus geothermalis*

Das Bakterium *Deinococcus geothermalis* gehört zu der Gattung der *Deinococcaceae*-Bakterien, welche aerobe Bakterien sind. Dazu gehören außerdem Spezies wie *Deinococcus radiodurans* oder *Deinococcus proteolyticus*, welche zur Aufreinigung von radioaktiv verseuchten Abfällen eingesetzt werden. [50]

Erste Stämme des Bakteriums wurden in einer heißen Quelle in Agnano, Neapel, Italien gefunden, später auch vereinzelt in der Tiefsee. Diese Bakteriengattung ist sehr widerstandsfähig gegenüber Temperaturextrema und Strahlung. Aufgrund spezieller Reparaturmechanismen ist das Bakterium in der Lage, UV, IR und sogar γ -Strahlung zu trotzen. [51] Die optimale Wachstumstemperatur der Bakterienkolonie liegt zwischen 45 und 55 °C, wobei eine leicht pinke Oberflächenbedeckung auf dem Untergrund entsteht. Der gebildete Biofilm ist sehr dünn (*non-slimy*). Eine Kolonialisierung durch das Bakterium kann auf fast jedem Untergrund realisiert werden, wie in Abbildung 6 auf einer Siliziumoberfläche gezeigt wird. Im Gegensatz zu vielen anderen Bakterien besitzt das Bakterium *D. geothermalis* keine Geißeln, um sich fortzubewegen. [51–53]

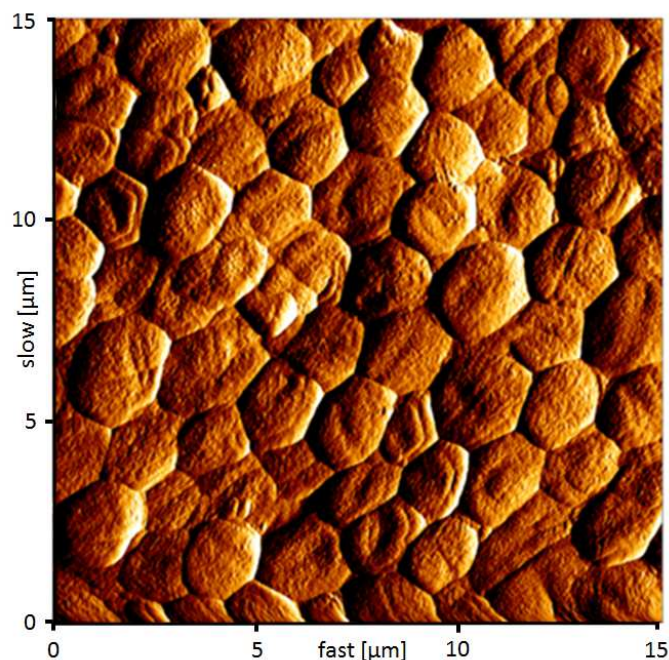


Abbildung 6: Oberflächenstruktur von *D. geothermalis*, gemessen mit dem AFM auf einer Siliziumoberfläche.

2. Theoretische Grundlagen

In der Industrie wird das Bakterium bei der Papierherstellung verwendet. Hierbei wird es als Biofilmproduzent in der Papierwasser-Maschine genutzt. Außerdem findet sich eine Verwendung für *D. geothermalis* als Oberfläche für einen Zweitbesiedler in Form einer anderen bakteriellen Spezies und des zugehörigen Biofilms. [54] Probleme bereitet das Bakterium als Biofouling auf Membrananlagen in der chemischen Industrie. Da es ein sehr resistentes Bakterium ist, ist es nahezu unmöglich *D. geothermalis* mit Säuren oder Lösungsmitteln von einer Oberfläche zu entfernen. [55] Neuere Anwendungsgebiete in der chemischen Industrie nutzen die reduzierenden Eigenschaften von *D. geothermalis*. In konzentrierten Lösungen kann das Bakterium Fe(III), U(VI) und Cr(VI) reduzieren. Durch genetische Modifizierung ist eine Reduktion von Hg(II) bei erhöhten Temperaturen möglich. Diese charakteristischen Merkmale lassen *D. geothermalis* als potentiell geeigneten Kandidaten für die biotechnologische Industrie erscheinen. Dabei kann das Bakterium in der Abfallbeseitigung oder der Sanierung von radioaktiv verstrahlten Regionen eingesetzt werden. [56]

2.5. Zellmembranen

Zellmembranen bestehen aus den beiden Hauptbestandteilen Lipide und Proteine. Ein individuelles Merkmal der verschiedenen Membranen ist das Verhältnis der beiden Bausteine zueinander. Die Membran von Mitochondrien enthält ein Lipid/Protein-Verhältnis von 4:1. [57,58] Am häufigsten kommen die Lipide in Form von Phospholipiden, schematisch in Abbildung 7 dargestellt, vor. Die Phospholipide werden in Glycerophosphatide und Sphingophosphatide unterteilt. Je nach Art der Kopfgruppe werden die Glycerophosphatide weiter in Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin unterschieden. Auf der Außenseite der Membran kommt hauptsächlich das Phosphatidylcholin vor, dabei weist die Innenseite einen hohen Anteil an Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin auf. Letzteres ist ausschließlich auf der Innenseite der Membran nachweisbar.

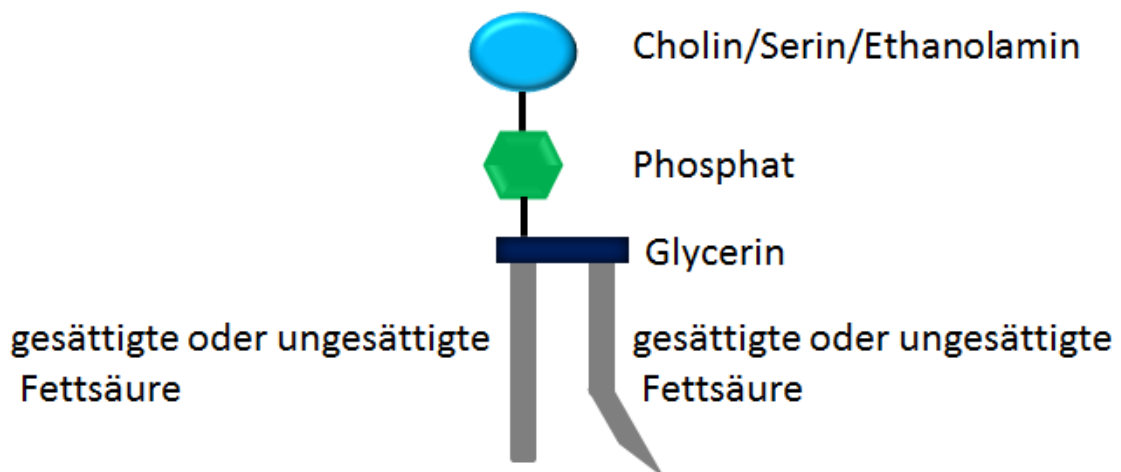


Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines Phospholipids. Mit den Hauptbestandteilen der Kopfgruppe bestehend aus Cholin/Serin/Ethanolamin und einer Phosphatgruppe. Der hydrophobe Teil des Phospholipids besteht aus einer gesättigten und einer ungesättigten Alkylkette. [57]

Das Phospholipid ist ein Amphiphil. Es besteht demnach aus einer hydrophilen Kopfgruppe und einer hydrophoben Schwanzgruppe. Diese Lipide lagern sich in einer Doppelschicht zusammen, um eine Membran zu bilden. Wie in Abbildung 8 dargestellt, richten sich in einem polaren wässrigen Milieu die hydrophilen Köpfe der Lipide jeweils nach außen und nach innen. Die hydrophoben Gruppen stehen sich innerhalb der

2. Theoretische Grundlagen

Membran gegenüber und bilden den Kern der Membran. Die Beweglichkeit der Membran ist allein durch die Fettsäuren der Lipide bestimmt, wobei die Ladung durch die Kopfgruppen selbiger Bausteine gegeben ist. Ein Beispiel für ein neutrales Lipid ist das Cholesterol.

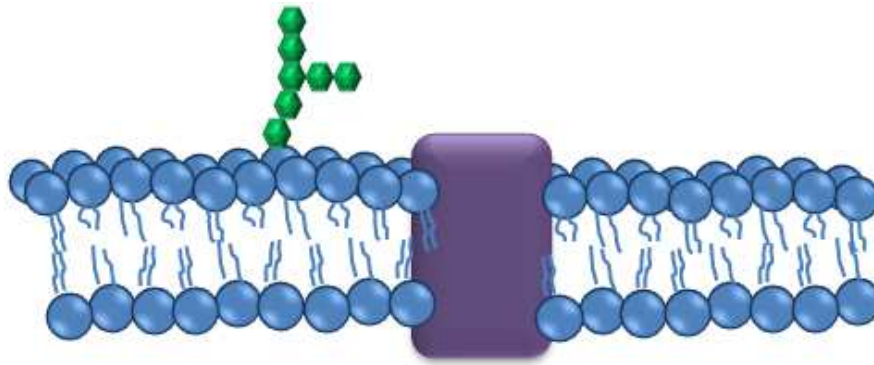


Abbildung 8: Schematische Darstellung einer Doppelschichtmembran bestehend aus Phospholipiden (blau), Proteinen (lila) und Glycokalyx (grün) in einem polaren Milieu. [59]

Es sind zwei Arten von Proteinen zu unterscheiden. Periphere Proteine sind außen auf der Membran durch elektrostatische Anziehung mit den Lipidkopfgruppen verankert. Sogenannte Integrale Proteine dringen in den hydrophoben Teil der Membran ein. Sehr große Moleküle, die die komplette Membran durchdringen, werden als Transmembranproteine bezeichnet. Aufgrund kleiner Kanäle innerhalb der Proteine, die die Doppelschicht durchziehen (lila in Abbildung 8), ist es Ionen und kleinen Molekülen möglich, die Membran zu passieren. Ionenkanäle spielen insbesondere in der Signalweiterleitung von Nervenzellen eine wichtige Rolle. Die elektrische Kaskade, die durch einen Reiz ausgelöst wird, muss durch das „Wandern“ eines elektrischen Potentials weitergeleitet werden. Dabei helfen die Ionenkanäle durch Einstromen von Na^+ -Ionen. Auf der Außenseite der Membran sind Kohlenhydratketten, sogenannte Glykokalyx, an Lipide oder Proteine gebunden. Diese Ketten sind wichtig für die Blutgruppeneigenschaften und die Zellerkennung durch das Immunsystem. [60,61]

Zellmembranen können als Fluide betrachtet werden. Das bedeutet, dass alle Bestandteile der Membran frei beweglich sind und sich innerhalb des Systems verschieben können. [62] Diese Beweglichkeit ist abhängig von der Temperatur und nimmt mit selbiger zu. Bei niedriger Temperatur fällt die Membran in sich zusammen und weist nur eine Dicke von ca. 6 nm auf. Steigt jedoch die Temperatur kann sie bis zu

einer Dicke von 9 nm anwachsen und nimmt eine solartige Konsistenz an. Die Körpertemperatur eines normalen gesunden Menschen bewirkt eine Dicke von ca. 8 nm bei der Membran. Durch ihre Beweglichkeit passt sich die Membran allen äußeren Veränderungen plastisch an. [63]

Die Funktion der Zellmembran besteht hauptsächlich darin eine Grenzsicht nach außen zu bilden. Dabei soll eine Barriere zwischen dem intrazellulären und dem extrazellulären Bereich geschaffen werden. Aufgrund ihrer semipermeablen Eigenschaft ist eine Zellmembran nicht für jeden Stoff durchlässig. Sehr kleine Moleküle wie Wasser können die Ionenkanäle die Membran passieren. Kleine lipophile und unpolare Moleküle sind in der Lage, durch einfache Diffusion die Membran zu durchdringen. Durch das Vorliegen eines Konzentrationsgefälles können diese Moleküle durch die Membran diffundieren, um den Konzentrationsunterschied auszugleichen. Die Aufgabe jeder Zelle wird durch Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellmembran gesteuert. Wenn sich ein Substrat an einen Rezeptor bindet, löst der Rezeptor elektrische Signale innerhalb der Zelle aus. Die Anbindung des Botenstoffs funktioniert nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip. So kann sich nur ein bestimmtes Molekül mit einer sehr spezifischen Geometrie an den Rezeptor binden. [57]

2.5.1. Künstliche Modellmembran

Auf dem Gebiet der Biophysik werden viele Erkenntnisse über die Funktion einzelner Bauteile oder der komplette Aufbau von Membranen durch die Konstruktion von künstlichen Modellmembranen erlangt. [64] Einer der ersten Wissenschaftler, der künstliche Modellmembranen dargestellt hat, war MUELLER ET. AL. im Jahre 1962. [65] Durch die Vereinfachung einer künstlichen Membran konnte in den folgenden Jahren das DANIELLI-DAVSON-MODELL, beschrieben 1935 von J. F. DANIELLI und H. DAVSON, bestätigt werden. [66] Das Modell zeigt Phospholipiddoppelschichten, die zwischen zwei Lagen von globulären Proteinen liegen. Dieses Modell galt als neu und revolutionär, obwohl bereits 1925 E. GROTER und F. GREDEL die Existenz einer Doppelschicht aus Lipiden postuliert haben. [67]

2. Theoretische Grundlagen

Als Bausteine, um eine solche künstliche Membran zu generieren, werden meist Phospholipide benutzt, da sie einen Hauptbestandteil der Zellmembranen darstellen. [68] Ein Beispiel für ein Phospholipid ist das 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DMPC), dargestellt in der LEWIS-STRICH-FORMEL in Abbildung 9.

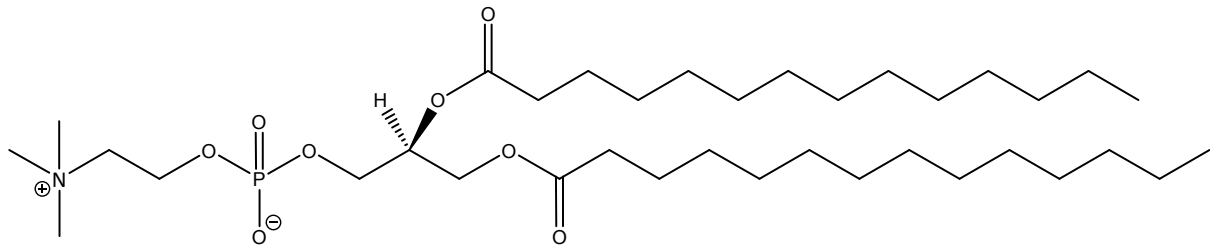


Abbildung 9: Darstellung von 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin in der Lewis-Strich-Form.

Phospholipide können aufgrund ihrer Struktur in Wasser selbständig Aggregate bilden. Dieser Vorgang der spontanen Zusammenlagerung wird *Self-Assembling* genannt. Dabei wird zwischen vier Untergruppen unterschieden:

- Monolage
- Doppelschicht
- Mizelle
- Vesikel (ULV, MLV)

Der Monolagenfilm bildet einfache Phospholipidstränge. Die Untergruppe der Doppelschichten besteht aus zwei sich exakt gegenüberliegenden Monolagen. Je nach Polarität des Lösungsmittels sind sie mit den hydrophilen oder dem hydrophoben Teil zueinander gewandt. Damit Doppelschichten entstehen können, muss die Konzentration deutlich größer sein als bei den Monolagen. [69,70]

Mizellen sind kugelförmige Gebilde, die aus einer Monolage von Phospholipiden bestehen. Sie bilden sich, sobald eine kritische Mizellenbildungskonzentration (engl. *critical micelle formation concentration, CMC*) überschritten wird. Dann ist die Oberflächenspannung des Lösungsmittels maximal vermindert. [71] Vesikel besitzen ebenfalls eine sphärische Form, bestehen aber nicht aus einer Monolage Phospholipid, sondern aus einer Doppelschicht. Dabei wird zwischen unilamellaren Vesikeln (ULV) und multilamellaren Vesikeln (MLV) unterschieden. [72]

2. Theoretische Grundlagen

2.6. Lipopolysaccharide

Lipopolysaccharide (LPS) sind der Hauptbestandteil der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien. In Abbildung 10 ist die Membran eines gramnegativen Bakteriums dargestellt. Auf der äußeren Seite der Membran sind die Lipopolysaccharide verankert. [73]

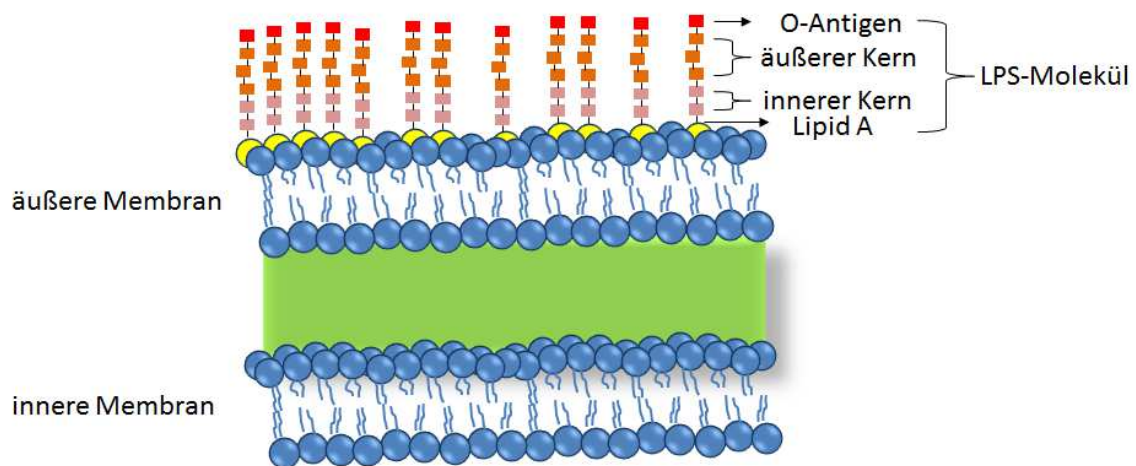


Abbildung 10: Schematische Darstellung der LPS-Moleküle auf der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien. Die äußere und innere Membran besteht aus einer Doppelschicht von Phospholipiden (blau). Zwischen der inneren und äußeren Membran befindet sich der periplasmatische Raum (grün). [73]

Lipopolysaccharide bestehen aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Teil, dem sogenannten Lipid A. [74] Dieses Lipid A ist ein Molekülbereich innerhalb des LPS und besteht aus β -1,6-verlinkten D-Glucose-Disacchariden. An die Saccharide sind die negativ geladenen Phosphatgruppen gebunden, die je nach Art des LPS in ihrer Anzahl variieren können. Somit ist das Lipid A außerdem für die Ladung des Moleküls verantwortlich. Des Weiteren fungiert dieser Teil des LPS als Anker für das gesamte Molekül. Es bindet durch seine gesättigten und ungesättigten Fettsäuren an die äußere Membran der Bakterien. Da es auf der Außenseite der Membran sitzt, ist es auch für die Funktion und die strukturelle Integrität der Membran zuständig.

Die 6'-Position der Lipid A-Polysaccharide mit einem Oligosaccharid ist glykosyliert. Dieser Bereich des Moleküls wird Kern genannt. Dieser besteht aus vielen weiteren Saccharideinheiten. Es wird zwischen zwei hauptsächlichen Bereichen unterschieden. [75,76] Der innere Kern ist über die Glykosylierung an das Lipid A gebunden. Daran verknüpft ist der äußere Kern, ebenfalls ein Teil des Lipopolysaccharides, der aus Monosacchariden besteht. [77] Oberhalb des äußeren Kerns ist das sogenannte O-Antigen gebunden. Dieses Antigen spielt für die Pathogenität eines Bakteriums eine entscheidende Rolle. Die Funktion dieses LPS-Bereiches ist es, dem Immunsystem „auszuweichen“. Somit zählt das LPS zu der Stoffklasse der Endotoxine. [78] Das LPS-Molekül kann sich in Rezeptoren auf der Oberfläche von menschlichen Blutzellen binden. Damit wird der Rezeptor langfristig blockiert. Durch die Bindung von LPS an ein Lipopolysaccharid-bindendes Protein (LBP), welches aus bis zu 450 Aminosäuren besteht, entsteht ein Komplex. Dieser interagiert mit dem Toll-like-Rezeptor (TLR)-4 von Monozyten und Makrophagen. Dabei wird eine intrazelluläre Signal-Kaskade ausgelöst. Diese bewirkt eine erhöhte Aktivität vom Transkriptionsfaktor (NF- κ B), woraus sich durch die gesteigerte Freisetzung von Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α), Interleukin (IL)-1 und IL-6 eine Entzündungsreaktion ableitet. [79–83]

2.6.1. LPS von *Escherichia coli*

In Abbildung 11 sind die einzelnen Bestandteile des Lipopolysaccharidmoleküls des Bakteriums *Escherichia coli* dargestellt. Das Lipid A besteht aus β -1,6-verlinkten Glycosamindisacchariden. An den Positionen 2, 3, 2', 3' sind die Zuckermoleküle mit R-3-Hydroxymyristat acetyliert, an den Positionen 1 und 4' sind sie phosphoryliert. Zwei der R-3-Hydroxyacyl-Gruppen, der nicht reduzierten Glycosamine, sind mit Laurinsäure (Dodecansäure) und Myristinsäure (Tetradecansäure) verestert.

2. Theoretische Grundlagen

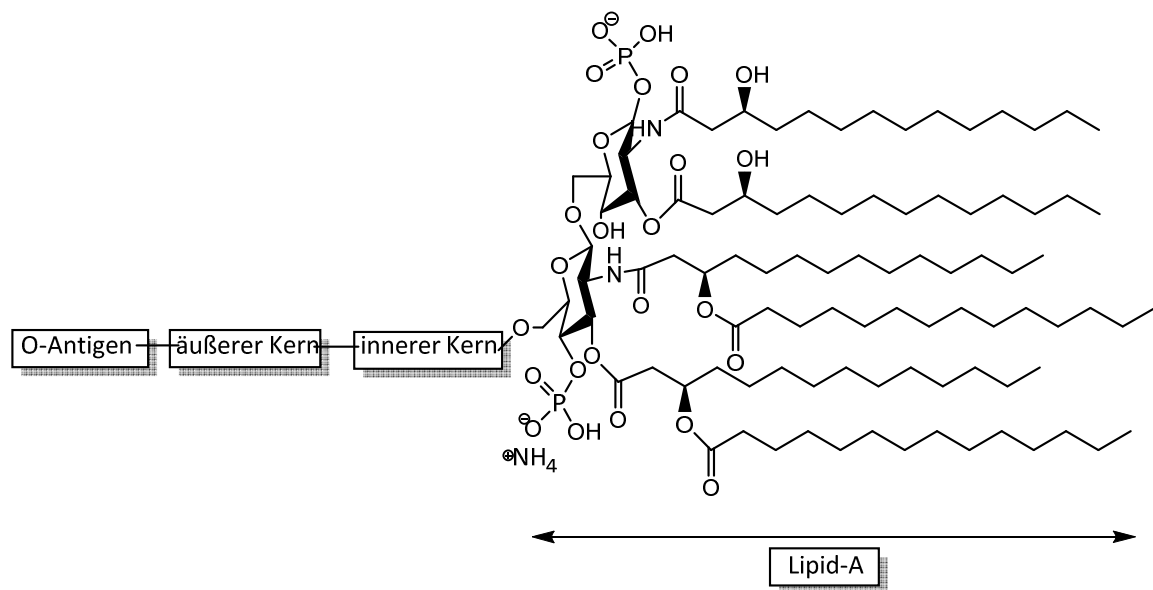


Abbildung 11: Molekulare Darstellung der Bestandteile des LPS-Moleküls von *E. coli*. [73]

Der innere Kern, der sich direkt über eine glycosidische Bindung an das Lipid A bindet, besteht beim LPS von *E. coli* aus 3-Deoxy-D-manno-octulosonsäure (KDO). Weitere Bestandteile des inneren Kerns sind L-Glycero-D-manno-heptose, Glucose, Galactose und *N*-Acetylglucosamin. Dieser Zuckerblock bildet den Anfang des hydrophilen Bereichs des LPS. [73] Im äußeren Kern des LPS-Moleküls befinden sich α -Glucose und α -Galactose, deren Reihenfolge sich je nach Bakterienart unterscheidet. Der O-Antigenbereich des LPS von *E. coli* bindet an ein α -Glucose Molekül des äußeren Kerns und besteht aus repetitiven Oligomereinheiten, die sich bis zu vierzigmal wiederholen können. Die häufigsten Bestandteile dieser Oligomereinheiten sind Tetrasaccharide. [84]

2.6.2. LPS von *Rhodobacter sphaeroides*

Der Lipid A-Baustein des LPS vom gramnegativen Bakterium *Rhodobacter sphaeroides* (LPS-RS) besitzt zwei Phosphatgruppen an den jeweiligen Polysaccharidengruppen. Die hauptsächlichen Bestandteile des Lipid A (rechte Spalte in Tabelle 1) sind Glucosamin und Glucosaminphosphat. Alle weiteren Komponenten des Lipid A, des inneren und äußeren Kerns sind in Tabelle 2 zusammengefasst. [85]

Tabelle 1: Chemische Komponenten des LPS Moleküls vom Bakterium *Rhodobacter sphaeroides*. [85]

chemische Komponente	Anteil am LPS-Molekül [nmol/mg]	Anteil am Lipid A Baustein des LPS [nmol/mg]
Glucosamin und Glucosaminphosphat	727	1257
2-Keto-3-deoxyoctan	433	-
Glucuronsäure	902	-
Glucose	42	-
Phosphat	1099	1089
Threonin	198	-
3-Hydroxydekansäure	744	1239
Tetradecansäure	15	20
3-Oxotetradecansäure	283	483
3-Hydroxytetradecansäure	311	491
7-Tetradecansäure	270	469

Das LPS-Molekül von *Rhodobacter sphaeroides* (Abbildung 12) gilt in der Medizin als Antagonist zu den toxischen LPS Varianten von *E. coli* oder *Salmonella spp.* Dabei fungiert das LPS-RS kompetitiv zu der Besetzung des Toll-Like-4 Rezeptors (TLR4).

2. Theoretische Grundlagen

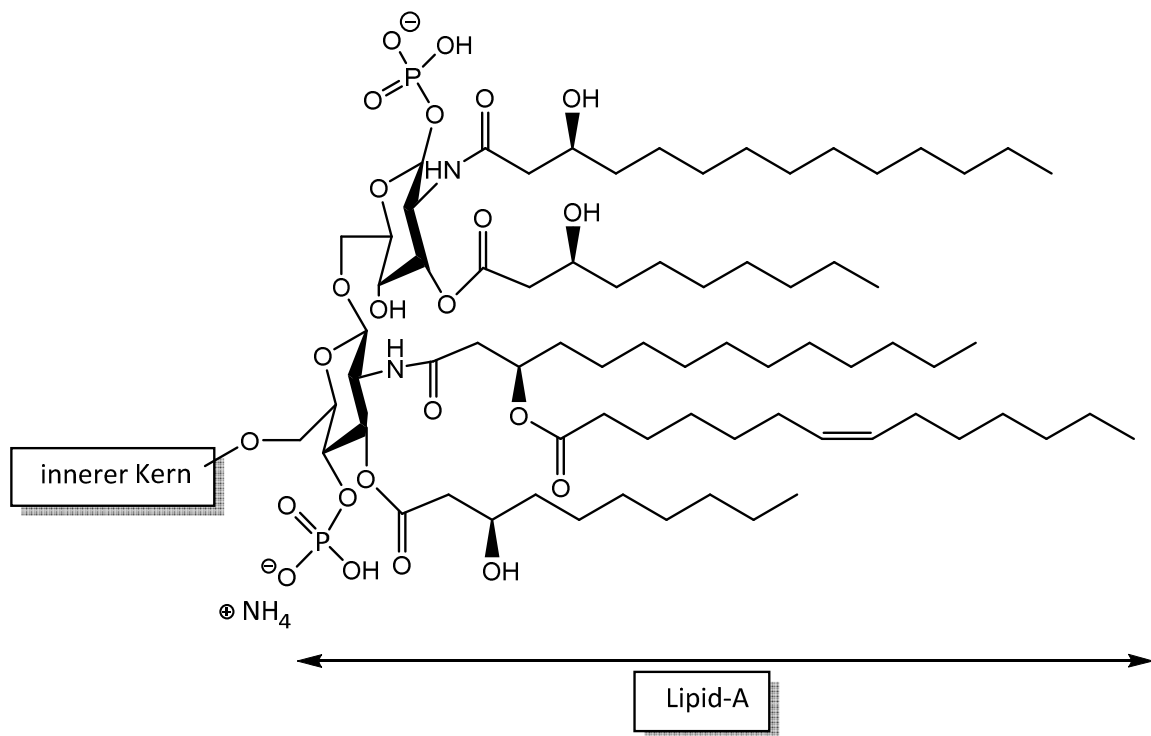


Abbildung 12: Molekulare Darstellung des Lipid A des LPS von *R. sphaeroides*. [86]

Durch eine Besetzung des TLR4-Rezeptors mit dem LPS *E. coli* wird eine Reaktionskaskade ausgelöst, die in Kapitel 2.5 beschrieben wird. Im Gegensatz dazu wird bei der Bindung von LPS-RS keine Kaskade ausgelöst. Daher galt oder vielmehr gilt das LPS-RS immer noch als nicht-toxisches Lipid. [85,87]

3. Methoden

3.1. Thermische Analyse

Thermische Analysen sind Verfahren, die physikalische und chemische Eigenschaften von den zu untersuchenden Proben in Abhängigkeit der Temperatur und Zeit messen. Durch Einstellung von Temperaturprogrammen werden physikalische Eigenschaften der Probe verändert und als Funktion der Temperatur in thermischen Analysekurven, den sogenannten Thermogrammen, aufgetragen. [88,89]

Theoretische Grundlagen der gesamten thermischen Analysen beruhen auf der Zustandsbeschreibung der GIBBS'SCHEN FUNDAMENTALGLEICHUNG (1), der CLAUSIUS-CLAPEYRON-GLEICHUNG (2) und der VAN'T HOFF'SCHEN GLEICHUNG (3). Die Gibbs'sche Fundamentalgleichung ist die wichtigste Gleichung in der Thermodynamik mit der Beschreibung der inneren Energie. [90]

$$dU = TdS - pdV + \mu dn \quad (1)$$

U = innere Energie

T = absolute Temperatur

S = Entropie

V = Volumen

n = Teilchenzahl

Eine Beschreibung der Lage und Form der Phasengrenzlinien in einem Phasendiagramm wird durch die Clausius-Clapeyron-Gleichung vorgenommen. [91,92]

$$\frac{dp}{dT} = \frac{\Delta H_{m,v}}{T^2 R} \quad (2)$$

3. Methoden

p = Druck

R = ideale Gaskonstante, $8,31447 \frac{J}{Kmol}$ [93]

$\Delta H_{m,v}$ = molare Verdampfungsenthalpie

Die van't Hoff'sche Gleichung nach Jacobus van't Hoff ist eine Abhängigkeitsbeschreibung der Gleichgewichtslage bezüglich der Temperatur. [93]

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial T} \right)_p = \frac{\Delta_R H_m^0 \cdot T}{RT^2} \quad (3)$$

K = Gleichgewichtskonstante

$\Delta_R H_m^0$ = molare Standardreaktionsenthalpie

3.1.1 Thermogravimetrische Analyse (TGA)

Erste quantitative, thermische Experimente wurden unter der Anleitung von W. NERNST und E. H. RIESENFELD 1903 durchgeführt. [94] Aber erst durch C. DUVAL 1953 ist die thermogravimetrische Analyse zu einer eigenständigen Messmethode entwickelt worden. [95]

Das Messprinzip einer thermogravimetrischen Analyse ist die Massenänderung der Probe in einem Ofen (Abbildung 13) aufgrund einer zeitlich geregelten Temperaturänderung. Die Änderung der Masse wird durch physikalische und chemische Vorgänge innerhalb der Probe hervorgerufen [96,97], z.B.:

- Trocknung/Dehydratation
- Zersetzung
- Oberflächenreaktion
- Oxidation

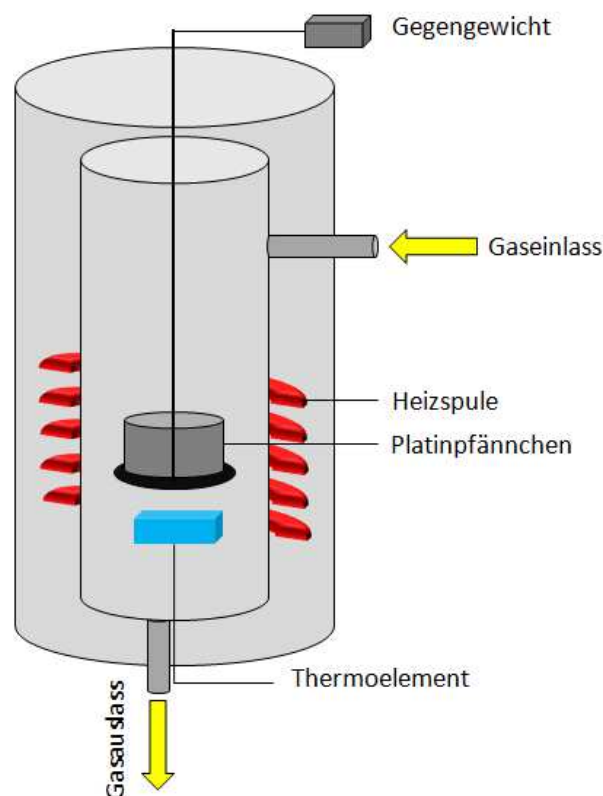


Abbildung 13: Schematischer Aufbau einer TGA-Apparatur. [89]

In einem Thermogramm können stabile Zwischenstufen als stationäre Bereiche sichtbar gemacht werden. Ungleichmäßige Verläufe, die nicht als Stufen oder direktes Absinken der Masse gedeutet werden können, symbolisieren eine thermisch instabile Substanz. Ein Anstieg innerhalb eines Thermogramms kann als Reaktion mit der umgebenden Atmosphäre des TGA gedeutet werden. [98] Bei der Messung eines Thermogramms sind Einflüsse auf die Art und Form der thermischen Analysekurve zu beachten. Die Heizrate und die Masse bei $t = 0$ sind wichtige Parameter dieser Messmethode. Durch zu schnelles Aufheizen können zum Beispiel eventuelle Zwischenstufen nicht exakt in der Auswertung wiedergegeben werden. [89] Eine spezielle Anwendung der thermogravimetrischen Analyse ist es den Wassergehalt der zu untersuchenden Probe zu ermitteln. [99,100]

3. Methoden

3.1.2. Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)

Im Jahr 1955 stellte S. L. BOERSMA die Methodik der Dynamischen-Differenz-Wärmestrom-Kalorimetrie in einer Messanordnung vor. [101]

Die heutzutage genutzte differential scanning calorimetry (DSC)-Methode ist genauso aufgebaut, wie sie erstmals 1964 von E. S. WATSON und O'NEILL beschrieben wurde. Nach diesen Vorgaben wurde von der Fa. Perkin Elmer ein erstes kommerziell erhältliches DSC-Analysegerät angefertigt. [102] Das Prinzip dieser Messmethode ist die Aufzeichnung von Reaktionen bzw. Umwandlungen der zu untersuchenden Probe aufgrund von Temperaturerhöhung oder Erniedrigung im Vergleich zu einer Referenzprobe. Umwandlungen können dabei intermolekularer oder intramolekularer Natur sein. [103]

Zwischen Analysesubstanz und Referenzprobe bildet sich eine Temperaturdifferenz aus, wenn es zu einer Umwandlung oder Reaktion innerhalb der Probe kommt. Solch eine Temperaturdifferenz wird als Wärmestrom detektiert. [104] Der Ofen des DSC hält beide Tiegel (Probentiegel und Referenzprobentiegel) auf gleicher Temperatur. Die Referenzprobe stellt in den meisten Fällen einen leeren Tiegel dar. Die Anordnung der Probe und der Referenzprobe nebeneinander in einem Ofen wird auch als Zwillingsanordnung bezeichnet. Aufgrund von Umwandlungen des Aggregatzustands der zu untersuchenden Substanz kann zusätzlich Wärme entstehen oder, wie bei einer Kristallisation, dem System Wärme entzogen werden. So verändert der Ofen die Wärmezufuhr, was als Wärmestromänderung im Thermogramm aufgezeichnet wird. Der erforderliche Wärmefluss (dH/dt) wird in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen. [89]

$$\frac{dH}{dt} = -\frac{dq}{dt} + (C_{Pr} - C_r) \cdot \frac{dT_p}{dt} - R \cdot C_{Pr} \cdot \frac{d^2q}{dt^2} \quad (4)$$

H = Enthalpie

t = Zeit

q = Wärmemenge

C_{Pr} = Wärmekapazität der Probe

C_r = Wärmekapazität der Referenzprobe

Mit (4) wird der theoretische Hintergrund der DSC beschrieben. Bei einer Phasenumwandlung innerhalb der Probe ändert sich auch die Enthalpie des Systems. [105] Der Zusammenhang zwischen der Wärmekapazität C_p und der Enthalpie H wird in folgender Gleichung (5) in Abhängigkeit von der Temperatur im Bereich von 0 K bis zur aktuell vorherrschenden Temperatur bestimmt. Dabei stellt $-\Delta H$ die Fläche unter der Kurve in einem Thermogramm dar. [106]

$$H = \int_{T_0}^{T_1} C_p dT \quad (5)$$

Durch die Messung der Enthalpieänderung können Phasenumwandlungen und endotherme bzw. exotherme Reaktionen bestimmt werden. [107]

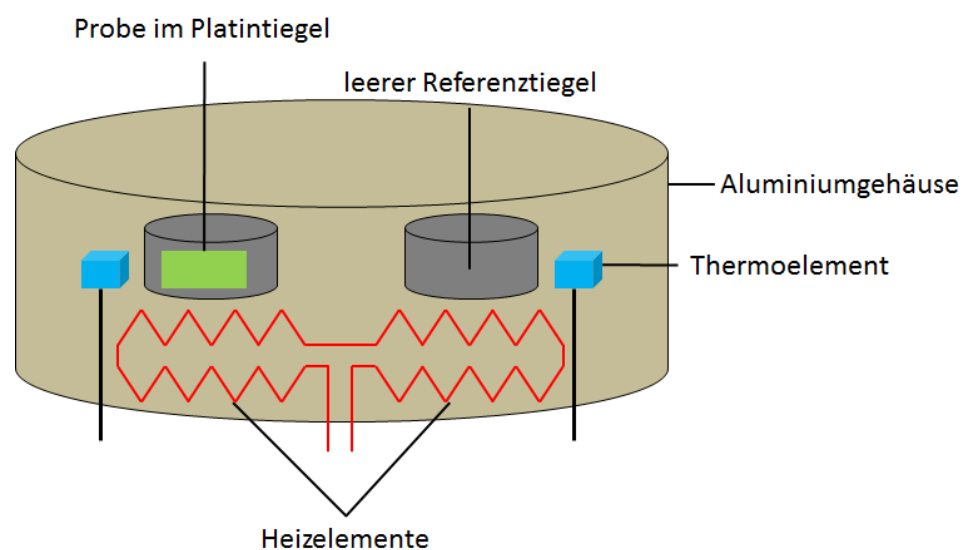


Abbildung 14: Schematischer Aufbau einer Zwillingsanordnung in einer DSC. [108]

3. Methoden

Das Heizelement ist, wie in Abbildung 14 gezeigt, direkt unter den beiden Tiegeln angeordnet und heizt beide Proben gleichmäßig auf. Das Thermoelement misst mehrmals pro Sekunde den Temperaturunterschied in beiden Tiegeln, um den Wärmestrom zu regeln. Der Wärmestromwiderstand ist bei der Wärmestromkalorimetrie temperaturabhängig. Alle Heizleistungsunterschiede werden direkt proportional in eine elektrische Spannung umgewandelt. Diese ist dem entsprechenden Wärmestrom der Probe direkt proportional. [108]

3.2. UV/Vis Spektralphotometer

Die Entdeckung des Zusammenhanges zwischen Schichtdicke und Lichtintensitätschwächung wird J. H. LAMBERT 1760 zugeschrieben, obwohl er bereits 1729 von P. BOUGUER festgehalten wurde und sogar von Lambert in seiner Arbeit zitiert wurde. [109,110] Dieser Zusammenhang beschreibt, die Abnahme der Lichtintensität, wenn sie durch ein Licht absorbierendes Medium dringt. Die Lichtintensitätsabnahme ist dabei abhängig von der Konzentration des Mediums in einer Lösung, der Schichtdicke und dem zu messenden Stoff. [111]

$$E = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I_1} \right) = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (6)$$

E = gemessene Extinktion

I_0 = Intensität des eingestrahnten Lichtes

I_1 = Intensität des transmittierenden Lichtes

ε = Extinktionskoeffizient

c = Konzentration

d = Schichtdicke

Durch die Erweiterung von A. BEER 1852 wurde in dem in (6) dargestellten BOUGUER-LAMBERT-BEER'SCHEN GESETZ die Konzentration des Mediums in eine Abhängigkeit mit der Lichtintensität des transmittierenden Lichtes gestellt. [92]

Aufgrund der Lichtabsorption werden in dem Medium, welches das Licht absorbiert, Elektronenzustände verändert. Dabei findet ein Elektronenübergang vom elektronischen Grundzustand in einen angeregten Zustand statt. [112] Für elektronische Übergänge von einem Orbital in ein angeregtes, energetisch höheres Orbital sind bestimmte spezifische Anregungsenergien (Wellenlängen) notwendig. [113] Die Anregungsenergien für den jeweiligen Elektronenübergang sind in Tabelle 2 aufgezeigt.

3. Methoden

Tabelle 2: Aufstellung der Anregungswellenlängen (Bereiche) für elektronische Übergänge. [113]

Elektronenübergang	benötigte Wellenlänge λ [nm]
$\sigma \rightarrow \sigma^*$	< 200
$n \rightarrow \sigma^*$	160 – 250
$\pi \rightarrow \pi^*$	180 – 230
$\pi \rightarrow \pi^*$ (konjugiert)	210 – 750
$n \rightarrow \pi^*$	230 - 290

Als Chromophore werden Moleküle bezeichnet, die funktionelle Gruppen beinhalten, die n-Elektronen besitzen. Wenn ein Molekül diese funktionellen Gruppen aufweist, verschiebt sich das Absorptionsmaximum zu höheren oder niedrigeren Wellenlängen. In welche Richtung sich das Spektrum verschiebt, hängt von den Eigenschaften der Gruppen ab. Von einer Rotverschiebung oder auch *Bathochromie* wird gesprochen, wenn die funktionellen Gruppen einen +M-Effekt aufweisen. Diese Gruppen können durch freie Elektronenpaare die Delokalisierung von aromatischen Systemen verbessern und werden auch auxochrome Gruppen genannt. Das Gegenteil, die Blauverschiebung oder auch hypsochromer Effekt zeichnet sich durch Gruppen mit einem -M-Effekt aus. Im Absorptionsspektrum wird das stoffspezifische Maximum zur photometrischen Analyse verwendet. Je nach Substituenten (+M- oder -M-Effekt) können sich die Maxima des zu untersuchenden Stoffes zu höheren und niedrigeren Wellenlängen verschieben. [93] Die Strahlungsquelle in einem UV/Vis-Spektrometer besteht meist aus Wasserstoff- oder Deuteriumlampen, um den ultravioletten Wellenlängenbereich abzudecken. Im sichtbaren Bereich emittiert eine Wolframlampe Photonen für die Analyse. Des Weiteren können auch Xenonlampen eingesetzt werden, die beide Spektralbereiche abdecken. [114] Um eine bestimmte Wellenlänge, also monochromatisches Licht, für die Analyse zu nutzen werden Prismen oder Gitter eingesetzt. Sie werden vor der Lichtquelle installiert und trennen das Licht in seine Bestandteile auf. Die Variation der Lichtintensität übernimmt ein Eintrittsspalt, der sich je nach Lichtintensität öffnet oder schließt. Die Probenlösung befindet sich in einer rechteckigen Glasküvette oder in einer Quarzküvette, wenn mit UV-Licht gearbeitet wird, da Glas UV-Licht zu stark absorbiert. [89]

3.3. Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Die Rasterkraftmikroskopie (engl. atomic force microscopy, AFM) gehört zu den Rastersondenmikroskopiemethoden und wurde von G. BINNIG, C. F. QUATE und C. GERBER 1986 entwickelt, um Oberflächencharakteristika zu bestimmen. [115]

Das Messprinzip beruht auf der Wechselwirkung einer Spitze, die auf der Unterseite eines Cantilevers lokalisiert ist, mit der Probe. Der Cantilever ist eine biegsame Blattfeder die sich verbiegt, während die zu untersuchende Oberfläche der Probe abgerastert wird. [116] Um die gesamte Probe zu scannen, muss sich der Cantilever bewegen. Dies geschieht über die Verwendung eines Piezoelementes. Die Positionsänderung wird durch die Spannungsveränderung innerhalb des Elementes verursacht. Der in dieser Arbeit verwendete Mikroskoptyp ist geeignet, um statische Proben zu messen. Das bedeutet, dass sich der Cantilever bewegt und die Probe unbeweglich bleibt. [117] Während der Cantilever die Oberfläche der zu untersuchenden Substanz scannt, ergeben sich attraktive und repulsive Wechselwirkungen zwischen Probenoberfläche und Messspitze. Dabei wird folglich die biegsame Blattfeder vertikal und horizontal ausgelenkt. Diese Positionsänderung wird mit Hilfe eines Laserstrahls detektiert und von der Siliziumoberfläche des Cantilevers auf eine 4-Segment-Photodiode reflektiert. In der Photodiode wird die Höhenänderung der Blattfeder durch elektrische Signale zum Detektor weitergeleitet und dort zu einem Höhenprofilbild zusammengesetzt. Dabei entspricht jeder einzelne Pixel des Bildes einer genauen Höhenposition des Cantilevers. [118] Das Höhenbild, auch topographisches Bild genannt, ist nur eine Möglichkeit der Bildgebung. Eine weitere Einstellung ist das Fehler-Bild-Signal. Dieses Bild wird durch die Nachregelgeschwindigkeit der Cantileverauslenkung erzeugt. [116] In der Materialwissenschaft wird am häufigsten eine dritte Variante verwendet, das Phasenbild. Mit diesem Bild können Aussagen über Materialveränderungen, zum Beispiel über die Härte, gemacht werden. [119,120]

3. Methoden

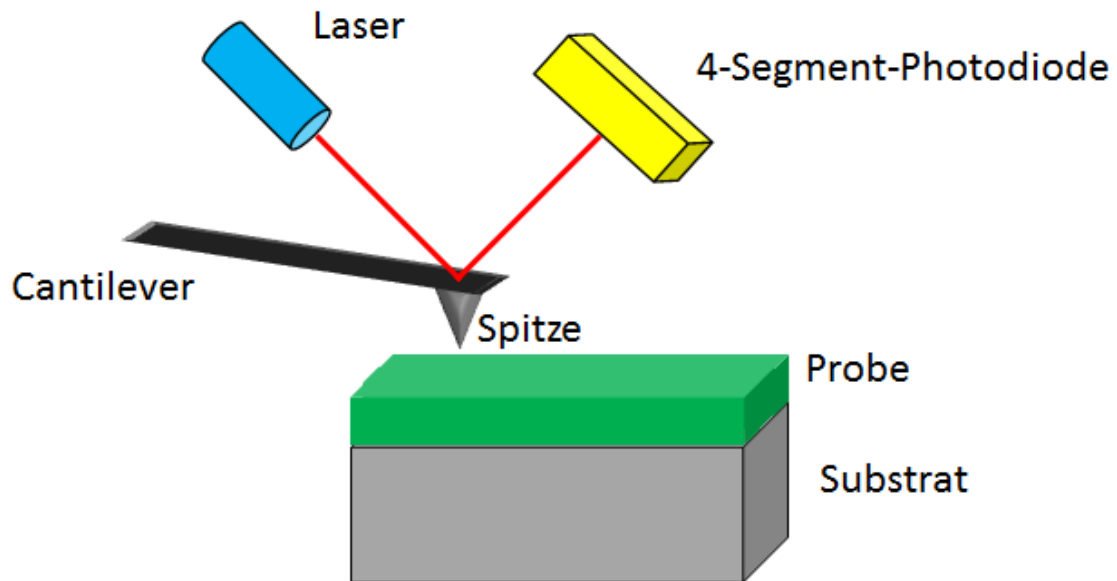


Abbildung 15: Schematische Darstellung einer in dieser Arbeit verwendeten Messanordnung eines Rasterkraftmikroskops.

Beim Kontaktmodus wird die Messspitze so dicht an die zu untersuchende Probenoberfläche gebracht, dass nur repulsive Kräfte an der Spitze zum Tragen kommen. Durch das Abrastern in der horizontalen Ebene bildet sich dabei eine konstante Kraft zwischen Probe und Spitze aus, welche dann rein aus der Auslenkung des Cantilevers in ein topographisches Bild umgewandelt wird. Dieser Vorgang wird bei konstanter Kraft innerhalb des Kontaktmodus durchgeführt. Eine andere Einstellung ist der Modus der konstanten Höhe, wobei der Cantilever immer auf einer Höhe gehalten wird. Dieser Modus wird nur selten eingesetzt, da durch zu hohe laterale Kräfte die Probe oder die Spitze beschädigt werden können. [121,122] Ein weiterer Modus ist der Nichtkontaktmodus. Dabei oszilliert der Cantilever nah an seiner Resonanzfrequenz über der Oberfläche, ohne diese zu berühren. Eine Oszillierung des Cantilevers wird durch die vorher gewählte Resonanzfrequenz erreicht. Der Cantilever ist dabei soweit von der zu untersuchenden Oberfläche entfernt, dass die attraktiven Wechselwirkungen dominierend sind. Eine Abbildung der Oberfläche geschieht durch die Frequenzänderung während des Abscannens der Probe in horizontaler Richtung. Diese Frequenzänderung ist ein Ergebnis der Wechselwirkung von der Spitze mit der Probenoberfläche. [123] Der Betriebsmodus, der in dieser vorliegenden Arbeit verwendet wurde, ist eine Kombination aus beiden oben vorgestellten Modi. Es wird

ebenfalls die Resonanzfrequenz des Cantilevers eingestellt, sodass dieser über der Probe oszilliert. Dabei wird die Messspitze soweit abgesenkt, dass die Probe kurze Zeit berührt wird und danach sofort wieder vertikal nach oben repulsiert. Dieser Modus wird intermittierender Kontaktmodus genannt. [124]

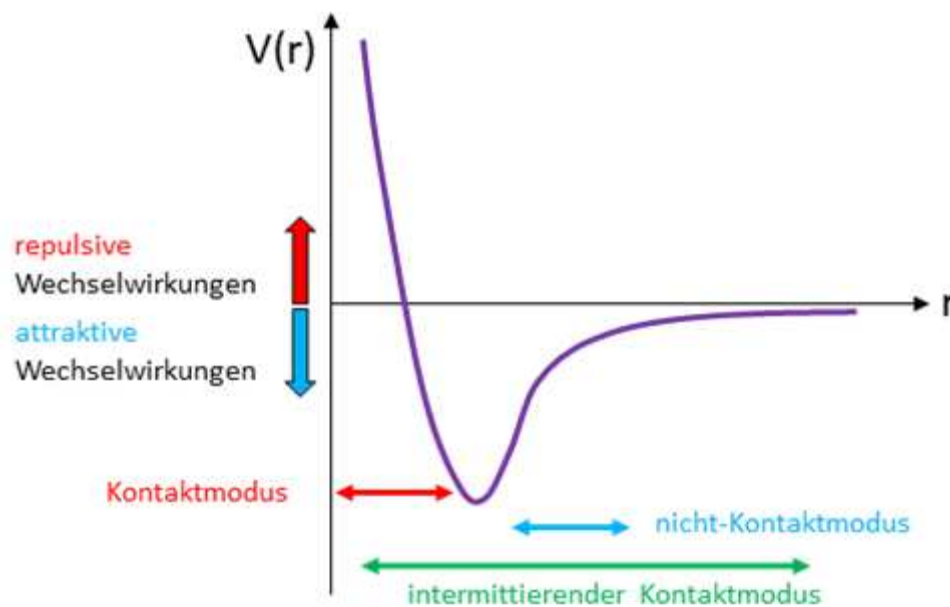


Abbildung 16: Betriebsmodi im Rasterkraftmikroskop dargestellt in einem Lennard-Jones-Potential.

Die Arbeitsmodi des AFMs sind in einem Energiepotentialdiagramm dargestellt (Abbildung 16). Der Verlauf des Potentials $V(r)$ im LENNARD-JONES-POTENTIAL ist durch folgende Gleichung gegeben:

$$V(r) = \frac{A}{r^{12}} - \frac{B}{r^6} \quad (7)$$

Dabei sind die repulsiven Wechselwirkungen proportional zu $\frac{1}{r^{12}}$ und die attraktiven Wechselwirkungen sind proportional zu $\frac{1}{r^6}$.

A und B sind Konstanten innerhalb der Gleichung. [93] In dem Potential wird verdeutlicht, in welchen Wechselwirkungsbereichen die einzelnen Modi arbeiten. Attraktive Wechselwirkungen sind zum Beispiel van-der-Waals-Wechselwirkungen. Die

3. Methoden

repulsiven Wechselwirkungen spielen in einem weiteren Betriebsmodus eine wichtige Rolle, der sogenannten Nanoindentationsversuche. In diesem Modus des AFM kann die Elastizität, der zu untersuchenden Probe bestimmt werden. Durch die Auswertung der resultierenden Kraftkurven aus den Nanoindentationsversuchen kann im Weiteren auch der Elastizitätsmodul bestimmt werden. [116] Dabei wird die Kraft bestimmt, die nötig ist, um mit der Spitze am Cantilever die vorher vorgegebene vertikale Strecke zurückzulegen. Im Lennard-Jones-Potential bewegt sich die Spitze zu sehr kleinen Abständen r . Es beginnt die PAULI-REPULSION als repulsive Kraft zu wirken. Dabei überlappen sich die Orbitale der Oberfläche und der Spitze, wobei sich dann die Elektronen mit gleichem Spin abstoßen. Die benötigte Kraft steigt an diesem Punkt exponentiell an. Die ermittelte Kraft $F(h)$ ist über das Hooke'sche Gesetz der Federkonstante k mit der Auslenkung des Cantilevers $r(h)$ verbunden. [93]

$$F(h) = k \cdot r(h) \quad (8)$$

Dabei muss die Geometrie der Spitze in der Rechnung berücksichtigt werden. Dies geschieht durch den Ansatz von H. HERTZ in seinem nach ihm benannten HERTZ-MODELL. [125,126] Für die Einschränkung von elastischen Oberflächen, wie die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und der pyramidalen Spitze des AFM, ist die Modifikation des Hertz-Modells durch SNEDDON nötig. [127]

$$F = \frac{2}{\pi} \cdot \tan(\alpha) \cdot \frac{E}{(1 - \nu^2)} \cdot \delta^2 \quad (9)$$

$\tan(\alpha)$ = halber Öffnungswinkel der AFM-Spitze

E = Elastizitätskoeffizient

ν = Poissonzahl, für inkompressible Materialien wird $\nu = 0.5$ [128]

δ = Eindringtiefe

Der Oberflächendruck p_{Ober} einer sphärischen Probe, wird auch LAPLACE-DRUCK genannt wird. Er führt zu einer Versteifung der Membran, was gleichzeitig zu einem Anstieg der Elastizität führt. Mit der YOUNG-LAPLACE-GLEICHUNG ist ein mathematischer Zusammenhang zwischen den Parametern *Oberflächendruck* p_{Ober} , *Oberflächen-spannung* γ und dem Grad der *Oberflächenkrümmung* gegeben. [129] Die Oberfläche A_K einer Kugel mit dem Radius r wird wie folgt beschrieben:

$$A_K = 4 \cdot \pi r^2 \quad (10)$$

mit dem Volumen V_K :

$$V_K = \frac{4}{3} \cdot \pi r^3 \quad (11)$$

Wenn sich der Radius der Kugel um den Faktor dr ändert, folgen ebenfalls Veränderungen der Oberfläche und des Volumens, welche mit dA_K und dV_K beschrieben werden:

$$dA_K = 8 \cdot \pi r \cdot dr \quad (10.1)$$

und

$$dV_K = 4 \cdot \pi r^2 \cdot dr \quad (11.1)$$

Die Arbeit dW_{VK} , die geleistet werden muss, um das Volumen der Kugel um dr zu vergrößern ist genauso groß wie die Arbeit dW_{AK} , die verrichtet wird, um die Oberfläche dem neuen Radius anzupassen:

$$dW_{AK} = \gamma \cdot dA_K = \gamma \cdot 8 \cdot \pi r \cdot dr \quad (12)$$

und

$$dW_{VK} = p \cdot dV_K = p_{\text{Ober}} \cdot 4 \cdot \pi r^2 \cdot dr \quad (13)$$

Da die gesamte Änderung der geleisteten Arbeit gleich sind, folgt die Young-LaPlace-Gleichung für Kugeln (Gleichung 15) [130]:

3. Methoden

$$dW_{AK} = dW_{VK} \quad (14)$$

$$\gamma \cdot 8 \cdot \pi r \cdot dr = p \cdot 4 \cdot \pi r^2 \cdot dr \quad (14.1)$$

$$p_{ober} = \frac{2 \cdot \gamma}{r} \quad (15)$$

3.4. Konfokale Raster Lasermikroskopie (CLSM)

Die konfokale Bildgebung beruht auf dem Patent von MARVIN MINSKY, der als Postdoktorand an der Harvard University ein optisches System zur konfokalen Rastermikroskopie entwickelte. Dabei wird der Kondensor eines gewöhnlichen Mikroskops gegen eine Linse, die identisch mit der Objektivlinse ist, ausgetauscht. [131] Ein weiterer Unterschied zu einem normalen Lichtmikroskop ist, dass nicht die ganze Probe auf einmal beleuchtet wird. Durch eine Fokussierung, die ein sogenanntes Pinhole (engl. Nadelloch) vornimmt, wird nur ein kleiner Teil der Probe von der Lichtquelle erfasst. Um die zu untersuchende Substanz vollständig abzubilden, muss die Probe unter dem Licht hin und her bewegt werden. Durch die Beleuchtung entstehende Fluoreszenzen oder reflektierende Bereiche werden von einer Fotozelle aufgefangen und mittels Kathodenstrahlröhre (CRT) als Bild wiedergegeben. [132]

Durch seine Methode beschreibt Minsky die deutlichen Vorteile seines optischen Systems. Zum einen ist durch seinen Aufbau ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis zu erwarten, da die Probe nicht als Ganzes sondern in kleinen Abschnitten nacheinander analysiert wird. Zum anderen ist eine Verbesserung der effektiven Auflösung der Probe ein weiterer Vorteil. Des Weiteren sind durch die Möglichkeit der bewegten Probe ohne Verlust an Schärfe Messungen von großen Proben kein Problem, da die Substanz in weite xy-Richtungen bewegt werden kann, ohne dass eine neue Einstellung des Fokus nötig ist. Durch die Möglichkeit die Probe in x- und in y- Richtung zu bewegen, sind ganze optische Querschnitte durch eine zu untersuchende Substanz möglich. Dabei kann ein dreidimensionales Bild erzeugt werden, wenn ein definierter Abstand zur Probe gewährleistet ist. [133] Marvin Minsky beschreibt in seinem Patent zwei verschiedene Aufbauten von konfokalen Rastermikroskopen.

Die Durchlicht-Methode benötigt ein zweites Pinhole, welches konfokal (im gleichen Fokus) zur Beleuchtungsquelle und zum ersten Pinhole steht. Der Strahlengang ist schematisch in Abbildung 17 dargestellt. Von der Lichtquelle A fällt das Licht fokussiert durch das erste Pinhole B.

3. Methoden

Durch die erste Linse C werden die Lichtstrahlen auf die Probe D geleitet. Das gestreute Licht aus der Probe wird durch die zweite Linse E und dem zweiten Pinhole F auf die Fotозelle bei G fokussiert. Von dort aus wird der fotoelektrische Strom verstärkt und auf einer Kathodenstrahlröhre als Bild wiedergegeben.

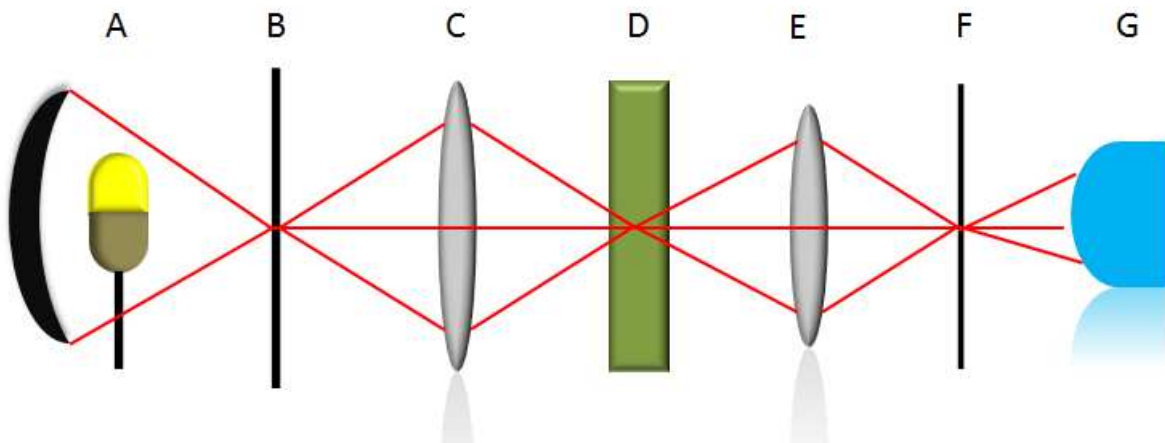


Abbildung 17: Schematischer Strahlengang eines Konfokalen Rastermikroskops im Durchlicht. [132]

Die zweite Mikroskopie-Art, die Minsky beschreibt, ist nach dem Prinzip des Auflichts aufgebaut (Abbildung 18). Das Licht von der Lichtquelle A wird ebenfalls durch ein Pinhole B geleitet und an einer Linse C auf die Probe D fokussiert. Die Strahlen von einem Spiegel E werden reflektiert und wieder über die Linse C geleitet. Sie treffen ein zweites Mal auf den dichromatischen Spiegel F, der die ersten Strahlen passieren lässt. Die reflektierten Strahlen werden allerdings abgelenkt und durch das zweite Pinhole G auf die Fotозelle H fokussiert. [131]

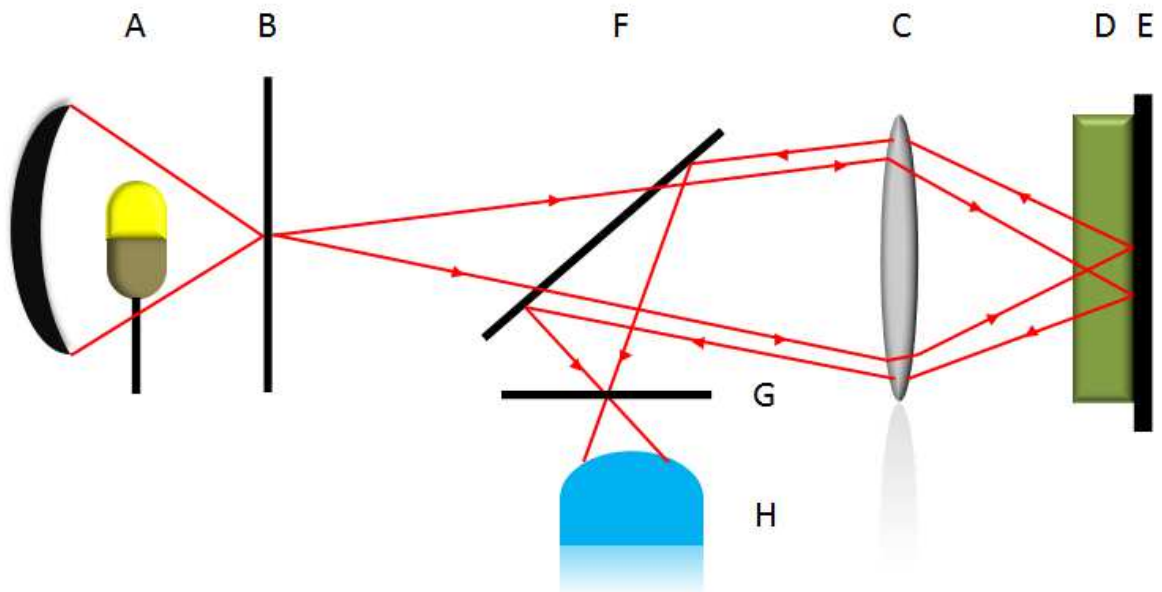


Abbildung 18: Schematischer Strahlengang eines konfokalen Rastermikroskops im Auflicht. [132]

Vor den Detektor, eine Photodiode, wird ein Sekundärelektronenvervielfacher geschaltet. Er dient dazu, schwache Photonensignale zu verstärken. Dabei trifft das aus der Fluoreszenz entsandte Photon auf eine Photokathodenschicht. Aufgrund des *photoelektrischen Effektes* wird aus der Oberfläche der Kathodenschicht ein sogenanntes Photoelektron ausgelöst. [134] Die neu entstandenen Photoelektronen besitzen eine kinetische Energie, die in einem linearen Zusammenhang mit der Frequenz der auf die Oberfläche treffenden Strahlung steht. Diese neu entstandenen Photoelektronen starten eine Kaskade, indem sie aus anderen Photokathodenschichten weitere Photoelektronen herauslösen. Am Ende der Kaskade ist eine Anode geschaltet, die die Elektronen abfängt. Der daraus resultierende Spannungsabfall wird als Ausgangssignal ausgewertet. [135–137] Die konfokale Rastermikroskopie wurde zu einer der wichtigsten bildgebenden Analysesystemen in der zellbiologischen Wissenschaft. [138,139]

3. Methoden

3.5. Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die *NMR-Spektroskopie* (engl. *nuclear magnetic resonance*) wurde 1946 von F. BLOCH, W.W. HANSEN und M. E. PACKARD, sowie zur selben Zeit von E. M. PURCELL, H. C. TORREY und R. V. POUND entwickelt, indem sie einen Nachweis für Kernresonanz-Signale lieferten. Dieses damals neue Analyseverfahren hat sich für Chemiker, Biochemiker, Biologen, Physiker und Mediziner zu einer der wichtigsten Analyseverfahren zur Strukturaufklärung entwickelt. [140]

Das Messprinzip der NMR-Spektroskopie beruht auf der physikalischen Grundlage des Kernmagnetismus. Damit ein Atomkern ein *magnetisches Moment* μ besitzen kann, muss ein Kernspin vorhanden sein:

$$\mu = \gamma P \quad (16)$$

Das *magnetogyrische Verhältnis* γ ist dabei eine stoffspezifische Konstante. Der Drehimpuls P ist eine gequantelte Größe und lässt sich mit Hilfe der *Kernspinquantenzahl* I bestimmen.

$$P = \sqrt{I(I+1)} \cdot \hbar \quad (17)$$

mit $\hbar = \frac{h}{2\pi}$

\hbar = *reduziertes Plancksches Wirkungsquantum*, $1.05443 \cdot 10^{-34}$ J s [93]

h = *Plancksches Wirkungsquantum*, $6.62517 \cdot 10^{-34}$ J s [93]

Die Kernspinquantenzahl kann Werte von $I = 0, \frac{1}{2}, 1, \frac{3}{2}, 2, \dots, 6$ annehmen. Um das magnetische Moment zu ermitteln werden Gleichung (16) und (17) kombiniert:

$$\mu = \gamma \cdot \hbar \cdot \sqrt{I(I+1)} \quad (18)$$

Aus Gleichung 16 wird ersichtlich, dass die Kernspinquantenzahl einen Wert größer Null aufweisen muss, damit der entsprechende Kern ein magnetisches Moment besitzen kann. Der Beitrag des Drehimpulses in z-Richtung beim Anlegen eines äußeren *Magnetfeldes* B_0 wird durch eine Richtungsquantelung dargestellt. [141]

$$P_z = \hbar \cdot m_I \quad (19)$$

Dabei ist m_I die *Magnetquantenzahl*. Durch diese Quantenzahl wird der stationäre magnetische Zustand des Kerns in einem Magnetfeld beschrieben:

$$m_I = I, I - 1, I - 2, \dots, -I \quad (20)$$

Wenn ein Atomkern die Kernspinquantenzahl von $I = \frac{1}{2}$ besitzt, wie das Proton, wird unter der Verwendung von Gleichung (19) und (20) folgender Drehimpulsbeitrag in z-Richtung erhalten (Abbildung 19).

$$P_z = \pm \hbar I \quad (21)$$

mit $I = \frac{1}{2}$ folgt:

$$\Rightarrow P_z = \pm \frac{1}{2} \hbar \quad (21.1)$$

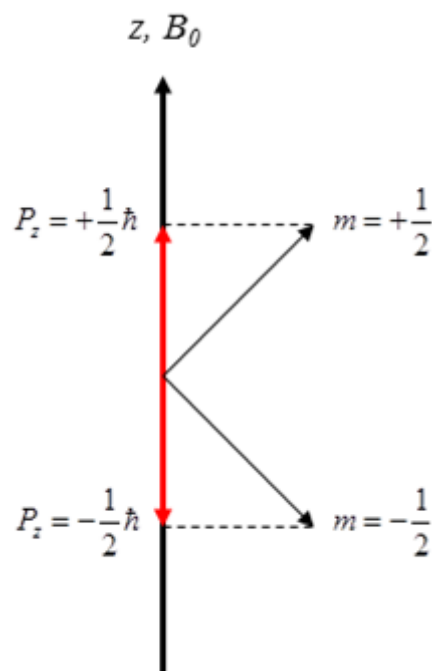


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Richtungsquantelung des Drehimpulses P_z in einem Magnetfeld für die Kernspinquantenzahl $I = \frac{1}{2}$. [140]

3. Methoden

Der Atomkern ist in dieser Betrachtungsweise kein starres Gebilde, er präzediert um die entlang dem Magnetfeld ausgerichtete z-Achse. Aufgrund dieser Rotation ergibt sich eine Präzessionsfrequenz, die auch unter dem Namen LARMOR-FREQUENZ ν_L bekannt ist.

$$\nu_L = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| B_0 \quad (22)$$

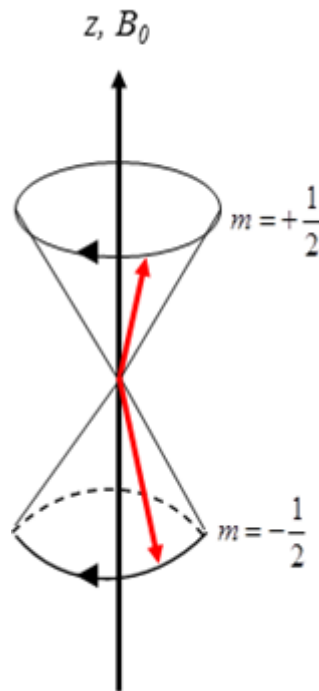


Abbildung 20: Schematische Darstellung des Doppelpräzessionskegels für einen Kern mit der Kernspinquantenzahl $I = \frac{1}{2}$. [140]

Wegen der Richtungsquantelungen der Kerndipole sind für jeden Kern nur ganz spezifische Winkel in der Rotationsachse erlaubt (Abbildung 20). Beim Proton, wie in diesem Beispiel, ist ein Winkel von $54^\circ 44'$ erlaubt. [142] Zur Bestimmung der potentiellen Energie E_{pot} eines Kerns, der sich in einem Magnetfeld B_0 befindet, wird Gleichung (23) verwendet:

$$E_{pot} = -\mu_z B_0 \quad (23)$$

mit $\mu_z = m \cdot \gamma \cdot \hbar$ folgt:

$$\Rightarrow E_{pot} = -m \cdot \gamma \cdot \hbar \cdot B_0 \quad (23.1)$$

Mit den $(2I + 1)$ Orientierungsmöglichkeiten für Kerne mit dem Spin I folgen ebenso viele Energiezustände. Solche Energieniveaus, welche in Abbildung 21 dargestellt sind, werden KERN-ZEEMANN-NIVEAUS genannt. Diese Aufspaltung der Energieniveaus wurde 1896 von P. ZEEMAN beschrieben. [143]

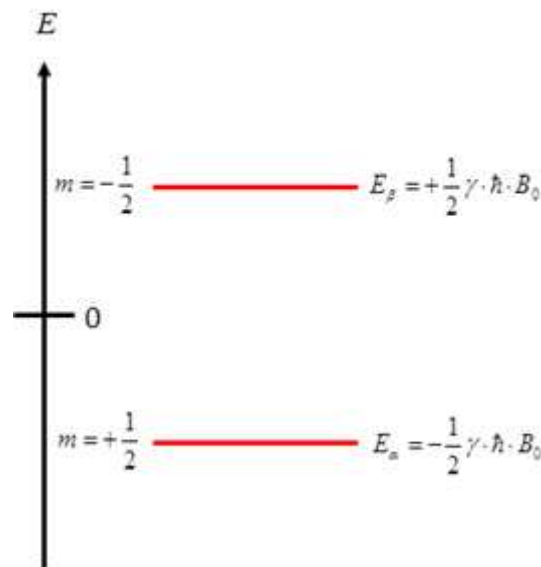


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Aufspaltung der Energieniveaus in einem Magnetfeld für einen Kern mit der Kernspinquantenzahl $I = \frac{1}{2}$. [140]

Beim Beispiel des Protons mit $I = \frac{1}{2}$ ergeben sich im Magnetfeld, wie in Abbildung 24 zu erkennen ist, zwei energetisch unterschiedliche Energieniveaus. In der Quantenmechanik sind diese Niveaus mit den sogenannten *Spinfunktionen* beschrieben. Das $m = +\frac{1}{2}$ Niveau wird der α -Funktion und das $m = -\frac{1}{2}$ Niveau der β -Funktion zugeordnet. Aufgrund der zum Magnetfeld parallelen Ausrichtung von μ_z bei $m = +\frac{1}{2}$ ergibt sich daraus ein energetisch günstigeres Niveau als für $m = -\frac{1}{2}$, wobei μ_z antiparallel zum Magnetfeld steht. Der Energieunterschied ΔE_{pot} beider benachbarten Niveaus wird mit folgender Gleichung (24) bestimmt.

3. Methoden

$$\Delta E_{pot} = \gamma \cdot \hbar \cdot B_0 \quad (24)$$

Die Proportionalität von ΔE_{pot} und dem Magnetfeld B_0 wird in Abbildung 22 veranschaulicht. [140]

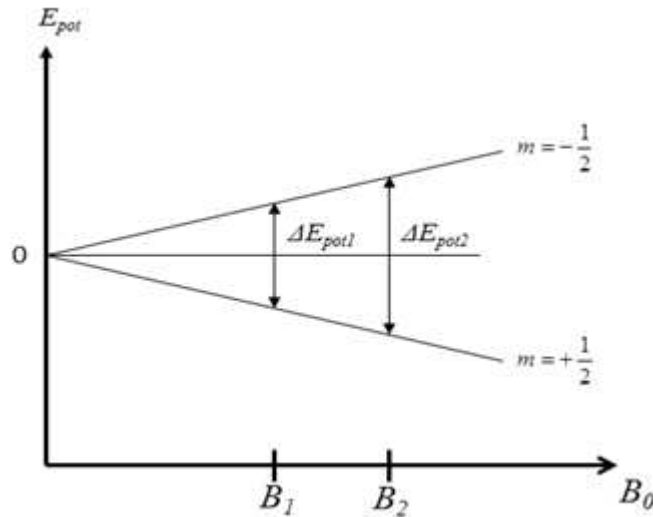


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Proportionalität von ΔE_{pot} und B_0 . [140]

Die Verteilung der Kerne auf die beiden Energieniveaus wird im thermischen Gleichgewicht durch die BOLTZMANN-VERTEILUNG beschrieben. Dabei gilt die Annahme, dass N_β die Anzahl der Spins im energiereichen und N_α die Anzahl der Spins im energiearmen Niveau sind:

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\frac{\Delta E_{pot}}{k_B \cdot T}} \quad (25)$$

k_B = BOLTZMANN-KONSTANTE, $1.3805 \cdot 10^{-23}$ J/K [93]

T = Temperatur in K

Die Abbildung 20 wird durch die Verteilung der Kerne auf die einzelnen Energieniveaus erweitert. Daraus resultiert eine *makroskopische Magnetisierung* M_0 in Richtung des Magnetfeldes (Abbildung 23). [141]

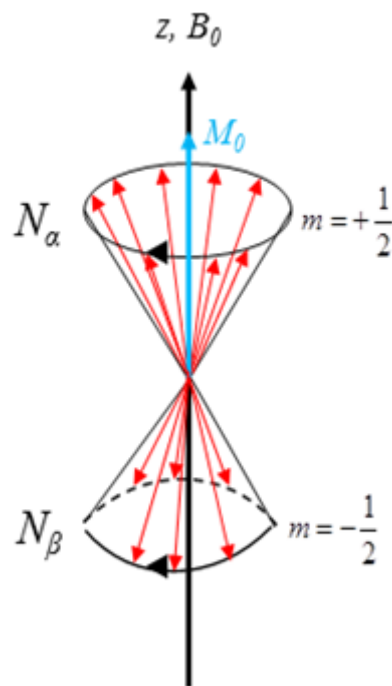


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Verteilung der Kerne auf dem Doppelpräzessionskegel und die daraus resultierende makroskopische Magnetisierung M_0 für einen Kern mit der Kernspinquantenzahl $I = \frac{1}{2}$. [140]

Damit während einer NMR-Messung Signale am Empfänger auftreten, muss die Resonanzbedingung der Kerne für einen NMR-Übergang erfüllt sein. Während der Messung mit einem NMR-Spektrometer wird ein Radiofrequenzfeld mit der Frequenz ω_0 eingestrahlt. Die Frequenz ω_0 erfüllt dabei die Resonanzbedingungen der Kerne. Durch die Frequenz werden die Kerne der zu untersuchenden Probe aus ihrem thermischen Gleichgewicht gebracht, wobei die makroskopische Magnetisierung M_0 senkrecht zur Richtung der eingestrahlten Frequenz um einen Impulswinkel θ ausgelenkt wird. Das Ausmaß des Impulswinkels ist dabei von der eingestrahlten Pulslänge τ , der Pulsstärke (Amplitude) B_1 und dem magnetogyrischen Verhältnis γ der Probe abhängig. [144]

$$\theta = \gamma \cdot B_1 \cdot \tau \quad (26)$$

Für den Impulswinkel gibt es zwei Spezialfälle, die in Abbildung 24 dargestellt werden:

- $\theta = 90^\circ$
- $\theta = 180^\circ$

3. Methoden

Nach einem 90° Puls werden alle Kernspins in der x, y -Ebene senkrecht zur z -Achse präzedieren, wobei die Magnetisierung der z -Komponente einen Wert von Null annimmt. Der 180° Puls führt zu einer Umkehrung der Besetzung aller Energieniveaus.

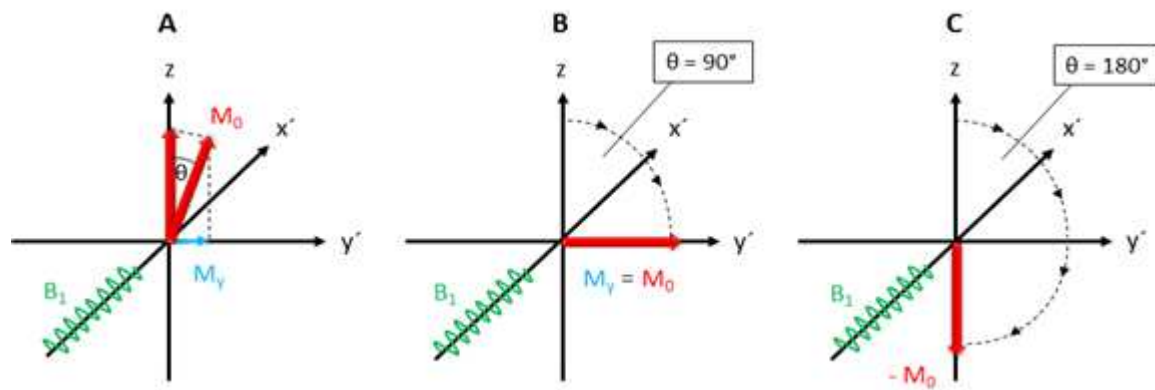


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Auslenkung der makroskopischen Magnetisierung M_0 durch den Impulswinkel in einem rotierenden Koordinatensystem. Mit θ = beliebiger Winkel (A), $\theta = 90^\circ$ (B), $\theta = 180^\circ$ (C). [140]

Ein Impulswinkel ungleich einem ganzzahligen Vielfachen von π im Bogenmaß führt zu einer Quermagnetisierung. [142] Nach Beendigung der Radiofrequenzeinstrahlung findet eine sogenannte Relaxation statt. Die Spinsysteme kehren in ihren ursprünglichen Gleichgewichtszustand zurück. Zuerst wird die longitudinale Relaxation beschrieben, die auch *Spin-Gitter-Relaxation* genannt wird. Diese mit T_1 charakterisierte Zeit stellt die Energieabgabe des gesamten Spinsystems an das umgebende Gitter dar. Die zweite Relaxation ist die transversale- oder auch *Spin-Spin-Relaxation*. Wie der Name sagt, beschreibt die T_2 -Zeit den Zeitraum, indem die Spins untereinander ihre Energie austauschen. Aufgrund von T_2 sinkt die Phasenkohärenz durch das Auffächern der Magnetisierung. [145] Das Signal, welches vom Empfänger detektiert wird, wird durch T_1 und T_2 geschwächt und es bildet sich eine Signalabfallskurve, der sogenannte *FID* (engl. *free induction decay*). Der FID ist eine gedämpfte, harmonische Schwingung.

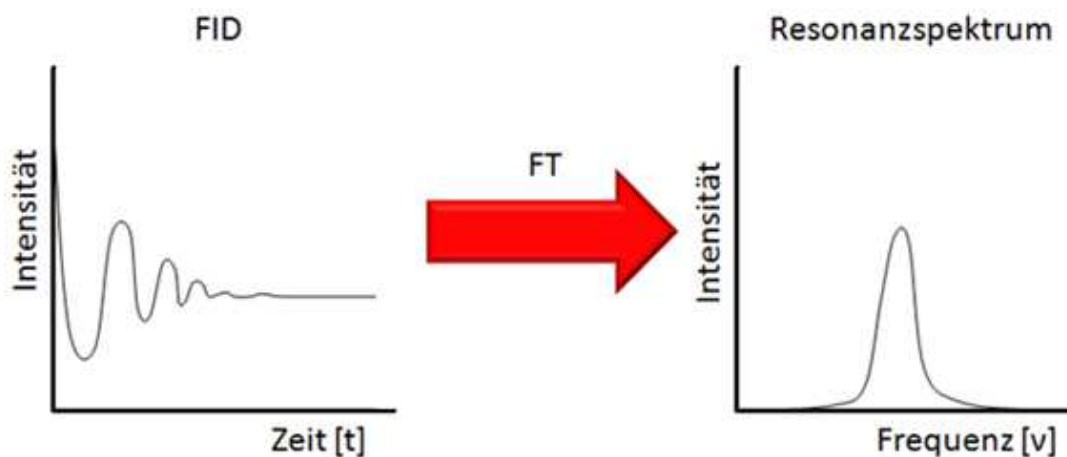


Abbildung 25: Schematische Darstellung eines FID (links) und das durch die Fourier-Transformation erhaltene Resonanzspektrum (rechts).

Diese Signalkurve wird mit Hilfe der FOURIER-TRANSFORMATION (FT), bei der die Zeitdomäne in eine Frequenzdomäne übertragen wird, in ein Kernresonanzspektrum umgewandelt (Abbildung 25). [141] Um die Spektren verschiedener Spektrometer miteinander zu vergleichen, wird die resultierende Frequenz [Hz] der Spektren in *parts-per-million* [ppm] umgerechnet. [146]

3.5.1. Kernresonanzspektroskopie mit gepulsten Feldgradienten (PFG-NMR)

Um den Effekt der Diffusion, genauer beschrieben in Kapitel 3.7, zu beobachten und die zugehörigen Diffusionskoeffizienten der Moleküle zu bestimmen, wird die *gepulste Feldgradienten-NMR* (PFG, engl. *pulsed field gradient*) verwendet. Mit geeigneten Pulsprogrammen wird die Homogenität des Magnetfeldes B_0 während der NMR-Messung gestört. Durch spezielle Gradientenspulen werden zusätzliche lineare Magnetfeldgradienten G generiert, die parallel zum Magnetfeld B_0 stehen. Somit wird ein inhomogenes Magnetfeld über die gesamte Probe verteilt, jeder Kern innerhalb der Messsubstanz befindet sich abhängig vom Ort in einem anderen Magnetfeld. [140]

3. Methoden

Der zusätzlich eingestrahlte Feldgradient wird so gewählt, dass auf die Kerne in der Mitte der Probe das „normale“ Magnetfeld des NMRs wirkt. Oberhalb der Mitte wird das Magnetfeld größer und unterhalb kleiner (Abbildung 26).

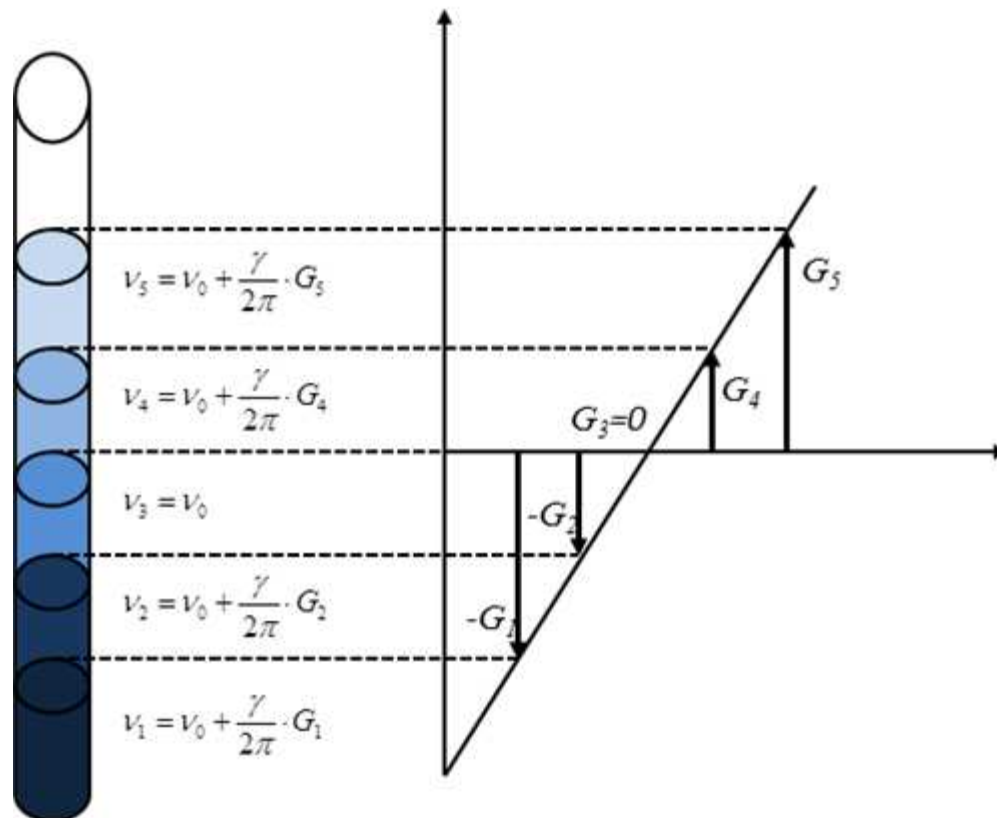


Abbildung 26: Schematische Darstellung der linearen Feldgradienten, die auf ein Magnetfeld B_0 wirken. [140]

Die Präzessionsfrequenz dieses Experimentes für einen Kern, der sich am Ort x befindet lautet:

$$v_x = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| \cdot (B_0 + G_x) \quad (27)$$

G_x = Feldstärke des Gradientenfeldes am Ort x

Damit hat jeder Kern an einem bestimmten Ort innerhalb des Messvolumens eine bestimmte Präzessionsfrequenz und ist somit ortsgeknennzeichnet. Die Gradientenlänge wird durch ein Zeitintervall δ vorgegeben. Nachdem der Gradient abgeschaltet wird, wirkt auf alle Kerne in der Probe nur noch das gesamte Magnetfeld B_0 . Sie präzedieren

dann alle mit derselben Frequenz ν_0 . [142] Um ein PFG-NMR-Experiment durchzuführen, sind zwei Pulsprogramme maßgeblich von Bedeutung.

Zur Messung von Molekülbewegungen über einen längeren Zeitraum wird das *Stimulierte-Echo-Experiment* durchgeführt. Dabei wird die transversale Magnetisierung in z-Richtung geschaltet und dort festgesetzt, um sie zu einem späteren Zeitpunkt neu zu detektieren. Dies ist bei langen Messzeiten nötig, weil aufgrund der geringen Frequenz der Molekülbewegungen gegenüber der Präzessionsfrequenz die T_1 -Relaxation deutlich kürzer ist als die T_2 -Relaxation. Im Pulsprogramm spiegelt sich dies als Aufspaltung des 180° Pulses in zwei 90° Pulse wider (Abbildung 27). Dabei liegt zwischen den beiden „neuen“ Pulsen eine Wartezeit τ_2 . Die y' -Komponente der makroskopischen Magnetisierung $M_{y'}$ wird durch den zweiten 90° -Puls in x' -Richtung innerhalb der τ_2 -Zeit entlang der z -Achse polarisiert. Hier findet die Relaxation nach T_1 aller Spins in ihren Grundzustand statt. Der letzte 90° Puls in x' -Richtung dient zur Drehung der Spins entlang der y -Achse, um nach einer Zeit τ_1 die maximale Amplitude zu erhalten. [147–149]

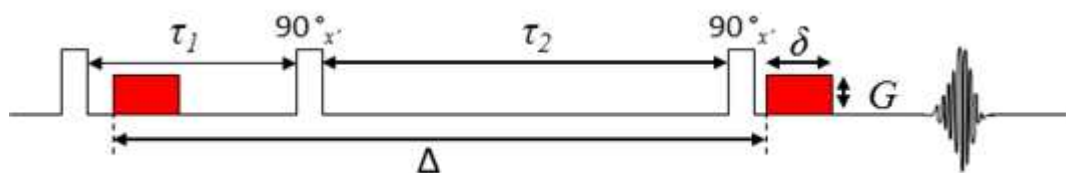


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Pulssequenz des Stimulierten-Echo-Experimentes. [149]

Das zweite Pulsprogramm, welches in Abbildung 28 schematisch dargestellt ist, wird HAHN-ECHO-PULSSEQUENZ genannt. E. L. HAHN stellte 1950 die nach ihm benannte Sequenz vor. [150]

3. Methoden

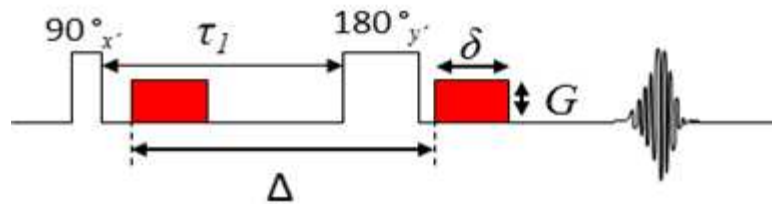


Abbildung 28: Schematische Darstellung der Pulssequenz des Hahn-Echo-Experimentes. [151]

Bei dem Hahn-Echo-Experiment wird zunächst ein 90° -RF-Puls in x' -Richtung eingestrahlt. Die makroskopische Magnetisierung M_0 wird dadurch auf die $x'y'$ -Ebene geklappt. Die Quermagnetisierung $M_{y'}$ nimmt aufgrund des Auffächerns der Spins ab (Abbildung 29). Nach einer Wartezeit τ sind die Spins innerhalb ihres Bereiches zueinander phasenverschoben. Darauf folgt ein 180° -RF-Puls in y' -Richtung. Als Folge dessen werden alle Spins invertiert, was aufgrund der Spiegelung an der y' -Achse zu einem Vorzeichenwechsel führt. Die Spins refokussieren dabei in y' -Richtung, wobei nach einer Wartezeit 2τ die maximale Amplitude erreicht wird und alle Spins sich wieder in derselben Phase befinden. Die T_2 -Relaxation lässt in 2τ die Signalintensität I_0 aus dem ersten 90° -Puls verschwinden. [152]

$$I = I_0 \cdot e^{\frac{-2\tau}{T_2}} \quad (28)$$

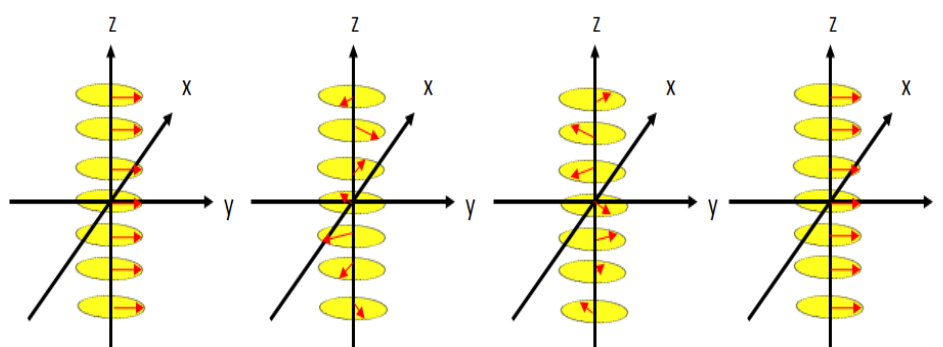


Abbildung 29: : Veranschaulichung des Einflusses auf die Quermagnetisierung durch einen Feldgradienten. a) Einstrahlung des ersten 90° x' -Pulses, b) Auffächern durch Einstrahlung des ersten Gradienten, c) Spininversion durch den 180° y' -Puls, d) Refokussierung durch den zweiten Gradientenpuls des Hahn-Echo-Pulsprogramms.

Die abnehmenden Intensitäten der NMR-Signale werden durch Gleichung (29) und durch die Abbildung 30 beschrieben. [153,154]

$$I = I_0 \cdot e^{\left(-D \cdot \gamma^2 \cdot G^2 \cdot \delta^2 \cdot \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)\right)} \quad (29)$$

I = beobachtete Intensität

I_0 = Grundsignalsintensität

Δ = Diffusionszeit

Eine Auswertung der PFG-NMR-Daten erfolgt mit der STEJSKAL-TANNER-AUFTRAGUNG. Dabei werden nach dem Ansatz von KÄRGER $\ln\left(\frac{I}{I_0}\right)$ gegen $\left(-D \cdot \gamma^2 \cdot G^2 \cdot \delta^2 \cdot \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)\right)$ aufgetragen. [155–158]

3.5.2. Festkörper-Kernresonanzspektroskopie

Anders als in einem Fluid können sich die Kerne in einem Festkörper nicht bewegen. Aus dieser starren Konstruktion folgt eine starke Linienverbreiterung im NMR-Spektrum aufgrund der Anisotropie zum Beispiel der dipolaren Kopplungen durch den Raum. [159]

Bei Flüssigkeits-NMR-Experimenten mitteln sich alle Anisotropien durch die stetige Bewegung der Moleküle aus, wodurch nur ein rein isotropes Signal generiert wird. Das anisotrope Signal der Festkörper hat den Vorteil, dass dadurch Strukturen innerhalb des Festkörpers aufgeklärt werden können. Durch die Überlagerung aller Wechselwirkungen werden keine Informationen einzelner Wechselwirkungen im Spektrum sichtbar. [160] Um dieses Problem zu lösen, haben Schaefer und Stejskal 1976 das sogenannte CP/MAS-Experiment vorgeschlagen. Dabei werden die Techniken der Kreuzpolarisation

3. Methoden

(CP), des Magic-Angle-Spinning (MAS) und des Weiteren der heteronuklearen Hochleistungsentkopplung miteinander verbunden. [161–163]

Durch die Verwendung der MAS-Technik wird die Reduzierung der Linienbreite in den NMR-Spektren erzielt. Bei diesem Verfahren wird die zu untersuchende Probe in dem magischen Winkel von 54.7° zum angelegten Magnetfeld B_0 positioniert und mit einer Frequenz, der sogenannten *MAS-Frequenz* ω_{MAS} , um sich selbst rotiert (Abbildung 30).

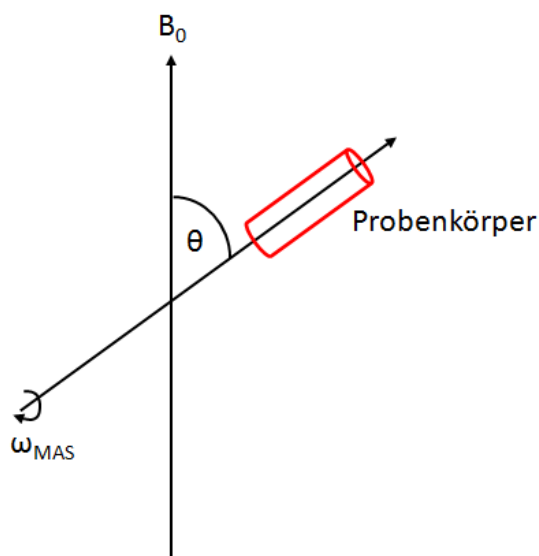


Abbildung 30: Veranschaulichung des MAS-Experimentes. Der Winkel θ beträgt 54.7° zum Magnetfeld B_0 . [159]

Die dipolaren Kopplungen zwischen zwei Spins durch den Raum in einem Festkörper führen zu einer starken Linienverbreiterung im NMR-Spektrum. Zur Verbesserung der Auflösung kann die MAS-Technik verwendet werden. Es gibt aber noch eine zweite Methode zur Verbesserung der spektralen Auflösung. Bei Betrachtung des Hamiltonoperators $\hat{H}_{S1,S2}$ der dipolaren Kopplung eines beliebigen Spins $S1$ mit einem Spin $S2$ wird es deutlich, dass es einen winkelabhängigen und einen spinabhängigen Teil gibt.

$$\hat{H}_{S1,S2} = -\gamma_{S1}\gamma_{S2}\hbar^2 \sum_i^{N_i} \cdot \sum_k^{N_s} \cdot \underbrace{\vec{r}_{ik}^{-3} (3 \cdot \cos^2 \theta_{ik} - 1)}_{\text{winkelabhängiger Teil}} \cdot \underbrace{(\hat{I}_{iz} \cdot \hat{S}_{kz})}_{\text{spinabhängiger Teil}} \quad (30)$$

γ_{S1}, γ_{S2}	= magnetogyrisches Verhältnis des Spins <i>S1</i> bzw. <i>S2</i>
θ_{ik}	= Winkel zwischen dem eingestrahlten Magnetfeld und des Richtungsvektors der beiden Spins
\vec{r}_{ik}	= Anstandsvektor der beiden Spins
$\hat{I}_{iz}, \hat{S}_{kz}$	= Spinoperatoren
N_i, N_s	= Besetzungszahlen der Spins

Der winkelabhängige Teil wird durch die MAS-Technik bis zu einer Frequenz von $\omega_{MAS} = 15 \text{ kHz}$ eliminiert. [159] Der spinabhängige Teil kann mit dem Verfahren der heteronuklearen Hochleistungsentkopplung beseitigt werden. Dabei wird eine Radiofrequenz (RF) zusätzlich parallel zum Magnetfeld B_0 eingestrahlt. Die eingestrahlte RF entspricht dabei der Resonanzfrequenz der *S2*-Kerne. Aufgrund des neuen Radiofrequenzfeldes werden Übergänge im *S2*-Kern angeregt, die eine parallele und antiparallele Ausrichtung zum magnetischen Moment μ_z^{S2} in z-Richtung besitzen. Daraus resultiert für den Hamiltonoperator ein Wert gleich Null. Damit kann eine Kopplung zwischen den Spins *S1* und *S2* verhindert werden und das *S1*-Spektrum bleibt erhalten.

Dieser Vorgang ist nur möglich, wenn *S1* und *S2* Resonanzfrequenzen besitzen, die weit voneinander entfernt liegen. [162,164] Aufgrund langer T_1 -Relaxationszeiten von bis zu 4000 s sind Messzeiten in der Festkörper-NMR oft sehr langwierig. Damit die Messzeit verkürzt werden kann, wird die Kreuzpolarisation verwendet. Um ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten, müssen die Experimente häufig wiederholt werden. Dabei bewirkt eine Verdopplung der Scanzahl ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis um $\sqrt{2}$. [140,141] Wenn die Scanzahl bei derart langen T_1 -Zeiten erhöht werden, würden die Experimente viel zu lange dauern. Um dieses Problem zu umgehen, wird die Kreuzpolarisation verwendet. Sie überträgt die Relaxationseigenschaften und

3. Methoden

die Magnetisierung zum Beispiel von Protonen auf den zu messenden unempfindlicheren ^{13}C -Kern. 1973 schlug PINES ET. AL. eine Pulssequenz für dieses Experiment vor (Abbildung 31). [163]

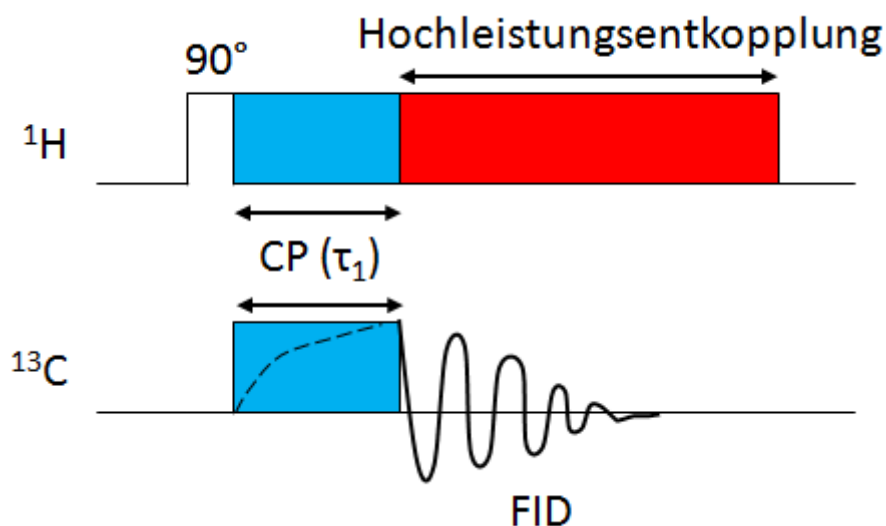


Abbildung 31: Pulssequenz der Kreuzpolarisation. Die Angleichung der ^{13}C -Kerne wird durch die gestrichelte Linie in der CP-Zeit dargestellt. [159]

Zunächst wird ein 90° -Puls auf die ^1H -Resonanzfrequenz eingestrahlt. Während der CP-Zeit τ_1 wird die magnetische Phase $B_{1\text{H}}$ um 90° verschoben. Die Kerne der Protonen präzedieren nun um die y-Achse. Zur selben Zeit werden die ^{13}C -Kerne durch die Einstrahlung des Radiofrequenzfeldes der Kohlenstoffe $B_{13\text{C}}$ den Protonen energetisch angenähert. [165] Dabei wächst der ^{13}C -Magnetisierungsvektor stetig bis zu einem maximalen Wert an. Nachdem eine maximale Amplitude erreicht wird, wird das ^{13}C -Spin-Feld abgeschaltet und der FID kann detektiert werden. Die ^1H -Kerne werden dabei hochleistungsentkoppelt. Die Zeitersparnis ist in diesem Beispiel die Differenz von $T_1^{1\text{H}}$ und $T_1^{13\text{C}}$. Der beschriebene Magnetisierungstransfer ist nur erlaubt, wenn die HARTMANN-HAHN-BEDINGUNG erfüllt ist.

$$\gamma_{1\text{H}} B_{1\text{H}} = \gamma_{13\text{C}} B_{13\text{C}} \quad (31)$$

Diese Bedingung bedeutet, dass die beiden Koordinatensysteme, in denen die ^1H - und ^{13}C -Magnetisierungsvektoren präzedieren, dasselbe Produkt aus gyromagnetischem Verhältnis und Magnetfeldstärke besitzen müssen. [166]

3.6. Dunkelfeldmikroskopie

Bereits im 17. Jahrhundert beschrieben VAN LEEUWENHOEK, HOOKE und HUYGENS eine mikroskopische Methode, die dem heutigen Dunkelfeldmikroskop sehr ähnlich ist. [167] Der Effekt, der dem Messprinzip zu Grunde liegt, ist der TYNDALL-EFFEKT. Er beschreibt, dass ein Lichtstrahl, der auf ein Objekt trifft, an diesem gestreut wird. Dabei muss sich der Brechungsindex beim Übergang vom Objekt in die flüssige Phase drastisch verändern. Benannt ist dieser Effekt nach J. TYNDALL, der ihn 1895 entdeckte. [168] Beim Dunkelfeldmikroskop wird der Strahlengang senkrecht zur Beobachtungsrichtung geführt. Diese Spiegelanordnung bewirkt, dass das Licht hohlkegelförmig auf die Probe fokussiert wird. Dadurch gelangt nur gestreutes Licht durch das Objektiv. Daher bleibt der Hintergrund dunkel und die Partikel, an denen sich das Licht bricht, erscheinen hell. Diese Messanordnung wird durch den von H. SIEDENTOPF 1909 entwickelten Kardiod-Kondensor verwirklicht. [169] Durch die Vermeidung der selektiven Detektion aller Streustrahlungen ist die Dunkelfeldmikroskopie in der Lage, eine Auflösungsgrenze unterhalb der ABBE'SCHEN GRENZE zu erzeugen. [167,170,171] Die Bewegung der Partikel innerhalb der Flüssigkeitsschicht beruht auf der Eigenbewegung der Teilchen. Es wird von der BROWN'SCHEN MOLEKULARBEWEGUNG gesprochen. Entdeckt wurde dieses Phänomen durch B. BROWN 1827 bei seiner Beobachtung der ruckartigen Bewegung von Pollen in einer Flüssigkeit. [172] Die Bewegung ist ein Effekt der thermischen Eigenbewegung und der Impulsübertragung der Partikel untereinander. Sie ist abhängig von der Temperatur, der Größe der Partikel und der Viskosität des umgebenden Mediums. Eine Ursache der BROWN'SCHEN MOLEKULARBEWEGUNG ist die Selbstdiffusion. Dieser Effekt ist als ein Transportprozess von Partikeln zu betrachten. Eine mathematische Beschreibung erfährt die Diffusion durch das 1. FICK'SCHE GESETZ. [93]

$$J = \frac{dN}{dt} = -D \cdot A \cdot \text{grad } c \quad (32)$$

J = Teilchenstromdichte

D = Diffusionskoeffizient

A = Fläche, die durchwandert wird

3. Methoden

$\text{grad } c$ = Gradient der Stoffmengenkonzentration

Die Teilchenstromdichte J ist eine proportionale Größe zum differentiellen Teilchenfluss $\frac{dN}{dt}$. Aufgrund der Tatsache, dass ein Konzentrationsausgleich, der durch die Diffusion angestrebt wird, immer von hoher zu niedriger Konzentration vollzogen wird, muss der Proportionalitätsfaktor, der Diffusionskoeffizient D , negativ sein. [93] Auch das Nanopartikel-Tracking des Dunkelfeldmikroskops beruht auf der Brown'schen Molekularbewegung. Zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius müssen zunächst zwei Annahmen getätigt werden. Es wird ein zylindrisches Gefäß mit suspendierten Partikeln betrachtet. Des Weiteren wird von einem Konzentrationsungleichgewicht ausgegangen, sodass die Konzentration auf der linken Seite des zylindrischen Gefäßes größer ist als die auf der rechten Seite.

$$c_L > c_R \quad (33)$$

Somit lassen sich die Partikelanzahlen beider Seiten unter Verwendung der mittleren linearen Verschiebung Δ_V wie folgt bestimmen.

$$N_L = \frac{1}{2} \cdot A \cdot c_L \cdot \frac{\Delta_V}{t} \quad \text{bzw.} \quad N_R = \frac{1}{2} \cdot A \cdot c_R \cdot \frac{\Delta_V}{t} \quad (34), (35)$$

Durch Gleichsetzen der Gleichungen 34 und 35 wird der differentielle Teilchenfluss $\frac{dN}{dt}$ erhalten.

$$\frac{dN}{dt} = \frac{1}{2} \cdot A \cdot \frac{\Delta_V \cdot (c_L - c_R)}{t} \quad (36)$$

$$\text{mit } \Delta_V = - \frac{(c_L - c_R)}{\text{grad } c} \quad (37)$$

Wenn die Gleichungen 32 und 36 zusammengeführt werden, liefert uns dieser mathematische Vorgang das EINSTEIN-SMOLUCHOWSKI-GESETZ.

$$D = \frac{\Delta_V^2}{2t} \quad (38)$$

Unter der Annahme eines konstanten Diffusionsflusses $\frac{dN}{dt} = A \cdot c \cdot v$ mit einer konstanten Geschwindigkeit v ergibt sich der Quotient aus der Kraft F , die auf die Partikel einwirkt und des Reibungskoeffizienten \Re nach STOKES [92,93]:

$$v = \frac{F}{\Re} = - \frac{\frac{RT}{N_A \cdot c} \cdot \text{grad } c}{6\pi \cdot r_H \cdot \eta} \quad (39)$$

$$\text{mit } \frac{dN}{dt} = A \cdot c \cdot v \quad \Longrightarrow \quad \frac{dN}{dt} = A \cdot \frac{RT}{N_A \cdot 6\pi \cdot r_H \cdot \eta} \cdot \text{grad } c \quad (40)$$

Aus der Kombination von Gleichung 32 und 40 ergibt sich die EINSTEIN-STOKES-GLEICHUNG:

$$D = \frac{RT}{N_A \cdot 6\pi \cdot r_H \cdot \eta} \quad (41)$$

Werden das Einstein-Smoluchowski-Gesetz und die Einstein-Stokes-Gleichung zusammengefasst, ergibt sich die Gleichung 42 zur Berechnung des hydrodynamischen Radius r_H . [93,173,174]

$$r_H = \frac{RT}{N_A \cdot 3\pi \cdot \Delta_V^2 \cdot \eta} \quad (42)$$

3. Methoden

3.7. Zeta-Potential-Messung

Geladene Oberflächen von Partikeln, die sich in einem flüssigen Medium befinden, können Moleküle oder Ionen in Mono- oder sogar Multilagen adsorbieren. [175] Diese angelagerte Schicht, deren elektrische Ladung entgegengesetzt zur Oberflächenladung der Partikel ist, wird STERN-SCHICHT oder auch HELMHOLTZ-SCHICHT genannt. OTTO STERN postulierte 1924, dass die Sternschicht als ein starres Gebilde angesehen werden soll. Das durch diese Schicht aufgebaute Potential nimmt linear mit zunehmendem Abstand r zum Partikel ab. [176] Des Weiteren erweiterte O. Stern die Schicht zu der STERN-DOPPELSCHICHT durch eine angrenzende diffuse Schicht, indem er die Theorien von HERMANN V. HELMHOLTZ [177,178] und LOUIS GEORGES GOUY und DAVID LEONARD CHAPMAN [179] vereinte. Innerhalb dieser Schicht, in der deutlich mehr Bewegung herrscht als in der starren Schicht, sinkt das aufgebaute Potential exponentiell mit dem Abstand r zum angrenzenden Partikel (Abbildung 32). [180]

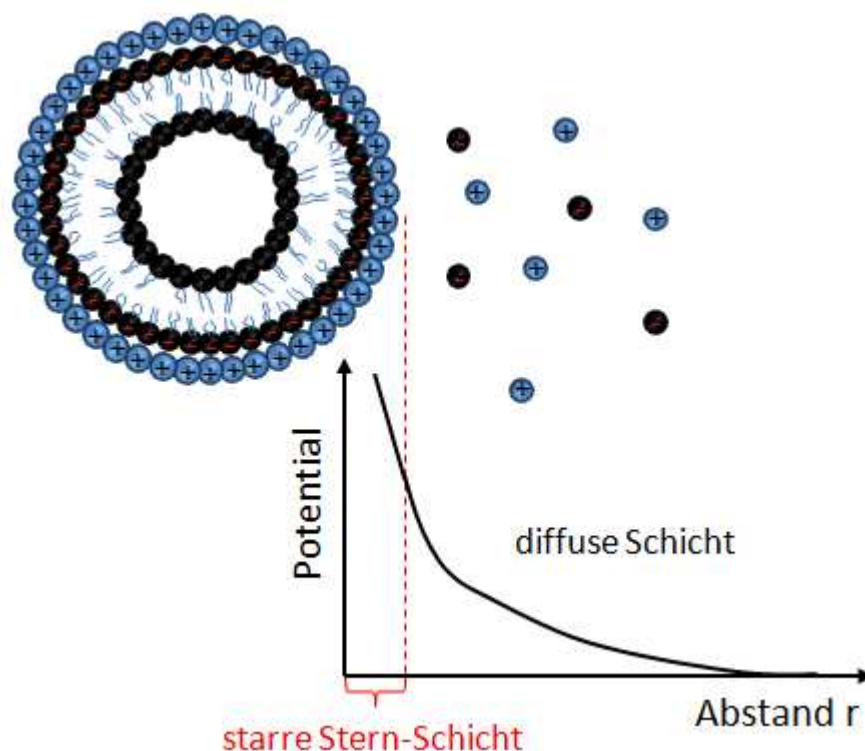


Abbildung 32: Darstellung der Schichten und deren Potentialverläufe an einem negativ geladenen Partikel. [93]

Bei einer Bewegung des Partikels und der daraus resultierenden Abscherung der diffusen Schicht, ergibt sich aus der Differenz der Potentiale des Partikels und dem umgebenden Fluid das Zeta-Potential. Die Stelle, an dem das Zeta-Potential den Wert Null annimmt, wird isoelektrischer Punkt (IEP) genannt. [175] Gemessen wird das Zeta-Potential eines Partikels meist durch eine Elektrophorese-Anordnung. In die Suspension der Partikel werden zwei Elektroden platziert. Beim Anlegen eines elektrischen Feldes E werden die Partikel auf eine Geschwindigkeit v beschleunigt und aufgrund der elektrostatischen Anziehung in Richtung der Gegenladung gezogen (Abbildung 33). Aufgrund der Bewegung des Partikels in dem angelegten elektrischen Feld ergibt sich eine Scherebene in der Stern-Doppelschicht.

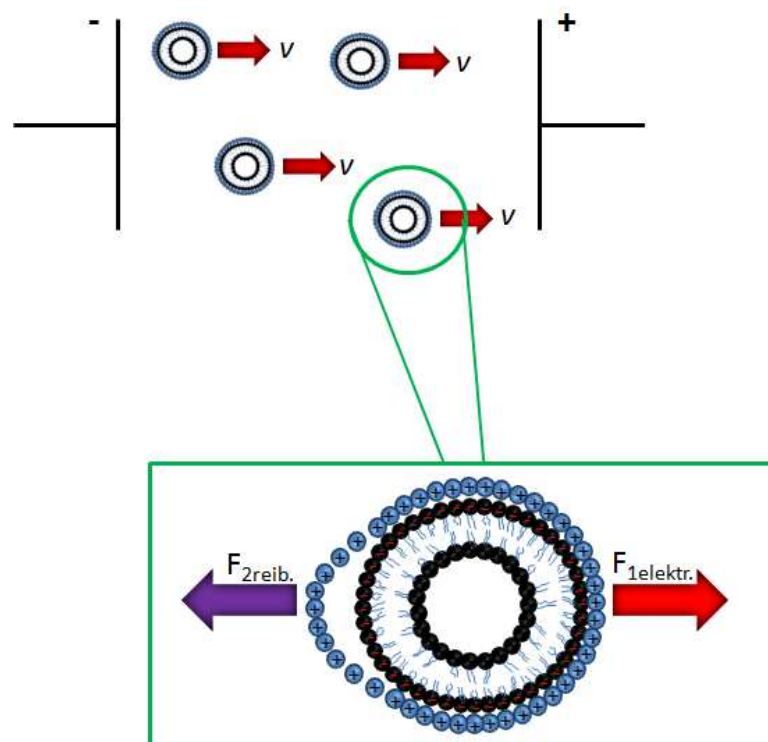


Abbildung 33: Schematische Veranschaulichung der Bewegung negativ geladener Partikel in einem elektrischen Feld (oben) und die dadurch resultierende Ladungswolkenverzerrung und Kräftegleichgewicht (unten). [93,175]

3. Methoden

Aus der Geschwindigkeit v der Partikel und dem elektrischen Feld E wird die *elektrophoretische Beweglichkeit* μ_E des Partikels bestimmt.

$$\mu_E = \frac{v}{E} = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} \quad (43)$$

η = dynamische Viskosität [Pa·s]

Gleichung (43) setzt sich aus zwei hauptsächlich wirkenden Kräften innerhalb des Versuchsaufbaus zusammen. Die treibende Kraft ist die des elektrischen Feldes $F_{1\text{elektr.}}$. Die negativ geladenen Partikel wandern zur positiv geladenen Elektrode.

$$F_{1\text{elektr.}} = E \cdot q \quad (44)$$

Dieser Kraft wirkt die Stokes Reibungskraft $F_{2\text{reib}}$ entgegen:

$$F_{2\text{reib.}} = -6 \cdot \pi \cdot r \cdot v \cdot \eta \quad (45)$$

Nach Henry ergibt sich für das Zeta-Potential: [182]

$$\mu_E = \frac{v}{E} = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} = \frac{2\varepsilon_0\varepsilon_r\zeta f(\kappa r)}{3\eta} \quad (46)$$

ζ = Zeta-Potential

ε_0 = Influenzkonstante

ε_r = Dielektrizitätszahl

$f(\kappa r)$ = Korrekturfunktion

Die Berechnung des Zeta-Potentials erfolgt dann durch die HÜCKEL-GLEICHUNG:

$$\zeta = \frac{3 \cdot v \cdot \eta}{2E \cdot \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r} \quad (47)$$

Die Hückel-Gleichung (Gleichung 47) gilt nur für kleine Partikel ($2 \cdot r \ll 1/\kappa$). Für große Partikel ($2 \cdot r \gg 1/\kappa$), die eine kleine diffuse Schicht besitzen, strebt die Korrekturfunktion $f(\kappa r)$ einen Wert von 1 an. Dann gilt die SMOLUCHOWSKI-GLEICHUNG [181]:

$$\zeta = \frac{v \cdot \eta}{E \cdot \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r} \quad (48)$$

$1/\kappa$ = Debye-Radius

3. Methoden

3.8. Theoretische Berechnung von NMR-Festkörper-Spektren

Die simulierten NMR-Spektren für die Festkörper-NMR-Experimente sind mit einem neu entwickelten Simulationsprogramm, dem *NMR-SMILED* (engl. *NMR Simulation of Motional Influence, Lineshape effects, chemical Exchange and Dynamics*), durchgeführt worden. [182]

Die Simulation beschreibt den Einfluss auf die Neuorientierung des Spinsystems durch Magnetfeldinteraktionen und externe Radiofrequenzen (RF). [183] Mit der Berechnung der zeitlichen Entwicklung der Spindichtenmatrix ρ können Aussagen über den Zustand eines Spinsystems getroffen werden. Dabei wird die LIOUVILLE-GLEICHUNG benutzt, um die molekularen Bewegungen, die die Relaxationen bewirken, zu simulieren. [184]

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = -\frac{i}{\hbar} L \rho \quad (49)$$

Durch den Liouville-Operator L werden dabei die Präzession in Relation zu den magnetischen Wechselwirkungen mit der Probe gestellt. Um den Diffusionseffekt darzustellen, werden alle Orientierungsmöglichkeiten der Moleküle mit einer endlichen Anzahl an Winkeln verwendet. [185]

- Φ_k
- Θ_l
- Ψ_m

Eine zeitliche Abhängigkeit der Besetzungen dieser Winkel im Molekül wird über die *Zeit t* mit einer Kinetik *erster Ordnung* beschrieben. Daraus folgt, dass die Neuorientierungsbewegungen mit folgender Gleichung (50) beschrieben werden kann,

$$\frac{\partial P}{\partial t} = \Gamma P \quad (50)$$

wobei der Besetzungsvektor P mit der Bewegungsmatrix Γ in Bezug gesetzt wird. [186] Durch alle Nicht-Null-Werte der kinetischen Matrix werden die Übergänge zwischen diskreten Orientierungen, wie sie in Gleichung 50 verdeutlicht sind, beschrieben. Im Gleichgewicht sind alle Besetzungszustände von der Zeit unabhängig. Durch Integration werden die Besetzungen im Gleichgewichtszustand erhalten, wenn ein orientierendes Potential vorhanden ist. Aufgrund der molekularen Bewegung beschreibt die Verteilungsfunktion die Fluktuation, die in diesem Fall durch die anisotrope Rotationsdiffusion dargestellt wird. Die Geschwindigkeitskonstanten werden aus zwei Korrelationszeiten τ_{\parallel} und τ_{\perp} berechnet. [187–189]

Die spektrale Auflösung innerhalb der ^2H -Festkörper-NMR des verwendeten Ansatzes der anisotropen Rotationsdiffusion beruht auf der Anzahl der benötigten Winkel n_{θ} , die durch den Winkelbereich Θ definiert sind. Um den Ordnungsparameter S_{zz} zu bestimmen ist es notwendig den Mittelwert der Integrale der Verteilungsfunktion f zu lösen. [188]

$$S_{zz} = \int_0^n f(\theta) \frac{1}{2} (3 \cos^2(\theta) - 1) \sin(\theta) d\theta \quad (51)$$

4. Praktische Durchführung

4.1. Acetylierung von Algenalginat

Zur Acetylierung des Algenalginats wurde eine 2 mol-%ige Lösung des Natriumalginats der Braunalge über einen Tropftrichter langsam unter Rühren in eine 0.1 molare Kalziumchloridlösung getropft. Anschließend wurden die entstandenen Kugeln für 24 h ohne Rühren in der Kalziumchloridlösung belassen. Um das Wasser aus den Kugeln zu entfernen, wurden die Algenalginatkugeln für 5-24 h in Pyridin gerührt. Zur Überprüfung des Wassergehaltes in den Alginatkugeln wurde eine Karl-Fischer-Titration durchgeführt. Sobald das Wasser vollständig entfernt wurde, sind die Kugeln abfiltriert und mit Pyridin gewaschen worden. Die filtrierten Alginatkugeln wurden in 200 mL einer 1:1 (v:v) Pyridin : Essigsäureanhydrid-Mischung überführt und unter Rückfluss für 24 h bei 38 °C refluxiert. Der Rückstand wurde mit Wasser gewaschen, um die Kalziumschicht aufzulösen. Die Kugeln wurden in einer 0.05 molaren EDTA-Lösung suspendiert und im Anschluss gegen eine 0.1 molare NaCl-Lösung dialysiert. [190]

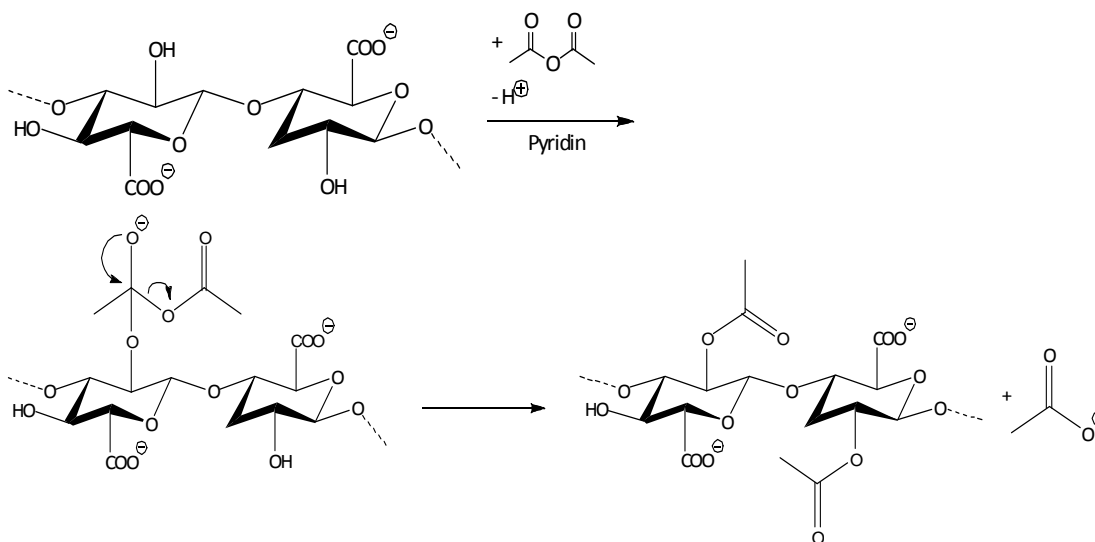


Abbildung 34: Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus einer Acetylierung des M-Blockes eines Braunalgenalginatmolekül.

4.2. Probenpräparation von Alginatgelen zur Analyse mittels UV/Vis-Spektroskopie

Die Acetylierung des Algenalginats wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie nachgewiesen. Hierfür wurde das Spektrometer *Evolution 201* der Firma *ThermoFischer* verwendet. Die zu untersuchende Substanz mit den Reagenzien wurde in eine Kunststoffküvette gegeben und mit der elektromagnetischen Strahlung bestrahlt. Alle Messungen wurden einer Blindprobenmessung mit Millipore Wasser angeschlossen.

Zum Nachweis der Acetylierung mittels UV/Vis-Spektroskopie wurden zunächst gleiche Volumenanteile von einer 2 molaren Hydroxylaminhydrochlorid- und einer 3.5 molaren Natriumhydroxid-Lösung gemischt. Diese Lösung muss bei Raumtemperatur 3 h lang ruhig stehen. In ein Teströhrchen wurden 2 mL dieser hergestellten Alkalihydroxylaminlösung vorgelegt und mit 1 mL der zu untersuchenden Substanz versetzt. Der pH-Wert der Testlösung wurde mittels 1 mL Zugabe einer 1:2 (v:v) verdünnten konzentrierten Salzsäure auf 1.2 gebracht. Zum Schluss wurde 1 mL einer 0.37 molaren Eisen(III)-chlorid in 0.1 molarer Salzsäure zugesetzt, damit die typische zu analysierende Braunfärbung entsteht. Der entstandene Komplex wurde im UV/Vis-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 540 nm detektiert. Um den genauen Acetylierungsgrad zu bestimmen, wurde eine Vergleichsprobe verwendet. Dazu wurde eine 0.004 molare Acetylcholinchloridlösung mit einer 0.001 molaren Natriumacetatlösung auf pH 4.5 eingestellt und auf 100% gesetzt. [191,192]

4.3. Probenpräparation von Alginatgelen zur Analyse mittels PFG-NMR

Für die ^1H -PFG-NMR- sowie die ^2H -PFG-NMR-Messungen wurde das *Avance AVX 400* Spektrometer der Firma *Bruker-BioSpin GmbH* verwendet. Des Weiteren wurde der Gradientenverstärker *BAFPA-40* und der Probenkopf *Diff-30* eingesetzt. Es wurden für die PFG-NMR-Messungen die 5mm- ^1H -PFG-NMR-Spule, sowie die 5mm- ^2H -PFG-NMR-Spule mit einer maximalen Gradientenstärke von 12 T/m bei einer Gradientenpulslänge

4. Praktische Durchführung

von bis zu 5 ms verwendet. Es wurden in beiden Fällen stimulated-echo Experimente mit folgenden Parametern durchgeführt (Tabelle 3):

Tabelle 3: Parameter der PFG-NMR-Messungen.

angeregter Kern	Gradientenpuls δ [μ s]	Diffusionszeit Δ [ms]	Gradientenstärke G [G/cm]
^1H	9	50	30-600
^2H	2	50	10-700

Die Auswertung aller NMR-Spektren erfolgte durch die Software „Topspin 3.0“ von der Firma Bruker. Bei der Auswertung der PFG-NMR-Messungen wurden mit Hilfe der abfallenden Intensitäten die Selbstdiffusionskoeffizienten, durch Anfitten der Kurven, berechnet. Das Fitten der Auftragungen wird mit der Software *OriginPro 9.0* durchgeführt.

Um die Diffusion von Wassermolekülen innerhalb einer Alginatgelmatrix zu beobachten, wurde deuteriertes Wasser eingesetzt und dementsprechend auch eine ^2H -PFG-NMR Messung ausgeführt. Die Proben wurden in unterschiedlichen Algenalginat : D_2O -Konzentrationen unter ständigem Rühren angesetzt, um eine Homogenität der Probe zu gewährleisten. Alle NMR-Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

4.4. Kultivierung von *D. geothermalis* auf R2A

Die Bakterienkulturen wurden auf zwei unterschiedliche Weisen kultiviert. Zum einen wurden einzelne Bakterienkolonien direkt auf den R2A aufgebracht oder es ist ein kompletter Rasen von *D. geothermalis* Biofilm erzeugt worden.

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendetes Bakterium.

Substanzname	Lieferant	Stamm	DSM Nummer	Erst- beschreibung
<i>Deinococcus geothermalis</i>	DLR Köln	AG-3a	11300	Ferreira et al. 1997 [52]

Der R2A-Agar ist ein Medium mit niedrigem Nährstoffgehalt und ist am besten für aerobe, heterotrophe Mikroorganismen wie das *D. geothermalis* geeignet. Die genaue Zusammensetzung des Agars ist in Tabelle 5 aufgelistet. Bei einer Temperatur von 25 °C besitzt der Agar einen pH-Wert von 7.2 ± 0.2 . [193,194] Um einen Agar mit einem dicht bewachsenen Biofilm zu erhalten, wurden wenige Milligramm *D. geothermalis* enthaltener Biofilm in einer physiologischen Natriumchloridlösung (0.14 molar) suspendiert. Aus dieser Suspension wurden 50 µL auf den Agar pipettiert und mit einem sterilisierten Glasstab gleichmäßig verteilt. Die Petrischale wird dann für 48 h bei 30 °C in den Inkubator gegeben.

Tabelle 5: Zusammensetzung des R2A-Agars. [194,195]

Bestandteil	Menge (g/L)
Agar	15
Casein Hydrolysat	0.5
Glucose	0.5
Hefeextrakt	0.5
Kaliumhydrogenphosphat	0.3
Magnesiumsulfat	0.024
Natrium-Pyruvat	0.3
Proteose-Pepton	0.5
Stärke	0.5

Wurden einzelne Bakterienkolonien benötigt, wurde der Biofilm mit einem sterilisierten Haken vom Agar aufgenommen. Der „kontaminierte“ Haken wurde anschließend über die Hälfte der neuen Agarschale geführt. Der Haken wurde erneut sterilisiert, und durch die belegte Hälfte des Agars auf eine unberührte Stelle geführt. Nach Beendigung dieses Vorgangs wurde auch diese Petrischale für 48 h bei 30 °C in den Inkubator gegeben.

4. Praktische Durchführung

In dieser Arbeit wurde für die thermischen Analysen auf Cellulose gewachsener Biofilm verwendet. Dazu wurden erneut wenige Milligramm Biofilm in einer physiologischen Natriumchloridlösung (0.14 molar) gegeben. Aus dieser Suspension wurden 500 µL in ein Falconröhrchen überführt und auf 500 mL mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde ein Filter zwischen den Trichter und dem Sieb einer Filtrationsanlage eingelegt. Die *D. geothermalis* Suspension wurde in den Trichter überführt und mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abfiltriert. Nach dem Durchlauf der Lösung wurde der Filter entnommen und mit der Biofilmschicht nach oben auf dem Agar platziert. Verweildauer und Temperatur im Inkubator waren analog zu den ersten beiden Kultivierungsweisen.

4.5. Probenpräparation von *D. geothermalis* zur Analyse mittels TGA

Die thermogravimetrischen Messungen (Thermalmessung) wurden mit dem TGA-50 der Firma Shimadzu durchgeführt. Als Ofentiegel wurden Platintiegel für einen Temperaturbereich von Raumtemperatur bis 800 °C verwendet. Die Heizrate während der Messungen wurde auf 10 °C·min⁻¹ eingestellt. Es wurden Thermogramme in einem Temperaturbereich von RT (Raumtemperatur) bis 250 °C mit einer Heizrate von 10 °C·min⁻¹ aufgenommen. Die Isothermalmessungen vor der Rehydratisierung wurden in der TGA-50 bei einer Temperatur von 30 °C mit einer Biofilm-Probe der Masse von 10 mg durchgeführt. Die Proben wurden ohne Unterlage direkt in den Platintiegel gegeben.

4.6. Probenpräparation von *D. geothermalis* zur Analyse mittels DSC

Zur Bestimmung der Enthalpieänderung und der Verdunstungsrate des Biofilms wurden DSC-Messungen durchgeführt. Dazu wurden Isothermal- und Thermalmessungen mit dem DSC-7 der Firma Perkin Elmer Instruments durchgeführt. Für die Messungen sind die Abschnitte des mit Biofilm bewachsenen Cellulosefilters (Kapitel 4.4), welche eine Fläche von ca. 0.21 mm² besitzen, in der Trocknungskammer (Kapitel 4.7) vorgetrocknet worden.

Für die Isothermalmessungen wurden kaltverschweißte Aluminiumtiegel (Perkin Elmer Instruments) verwendet. Die eingestellte Temperatur bei den Messungen belief sich auf 30 °C. Diese Temperatur wurde für einen Zeitraum von bis zu 2 h beibehalten.

Bei den Thermalmessungen kamen wiederverschließbare Platintiegel (Perkin Elmer Instruments) mit einem Golddeckel zum Einsatz. Dabei wurde ein Temperaturbereich von -10 °C bis 40 °C mit einer Heizrate von 5 °C·min⁻¹ gewählt. Um die tiefen Temperaturen erreichen zu können, wurde der Probenkopf, der sich in einer Glovebox befindet, mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Alle Abkühlkurven sind mit einer Abkühlrate von 20 °C·min⁻¹ durchgeführt worden. Die Messungen von *D. geothermalis* in der DSC wurden mit Proben auf einem Cellulosefilter durchgeführt. Durch den Filter haben die Proben einen gleichbleibenden Kontakt zum Untergrund und es ergeben sich dadurch keine Fehler in der Geometrie der Probe.

4.7. Trocknung von *D. geothermalis* in der Trockenkammer

Zur Beobachtung verschiedener Trocknungsstufen wurde der Biofilm in eine Trockenkammer (Eigenkonstruktion) vorgetrocknet (Abbildung 35). Die Trockenkammer besteht aus einem zylindrischen Kolben, der sich nach unten hin verjüngt. In die Mitte ist ein Gitter platziert, um die Proben zu fixieren. Die Temperatur in der Trockenkammer wurde durch ein Wasserbad auf 30 °C geregelt. Über einen Schlauch wurde ein Stickstoff mit einem definierten Volumenstrom (125 mL·min⁻¹, 250 mL·min⁻¹ oder 500 mL·min⁻¹) in die Trockenkammer geleitet, um einen schwachen Wind bis zu einem starken Luftzug zu erzeugen. Die relative Luftfeuchtigkeit in der Trockenkammer wurde auf 20-30% eingestellt. Abgeschlossen wurde das System durch ein Septum (nicht abgebildet in Abbildung 35).

4. Praktische Durchführung

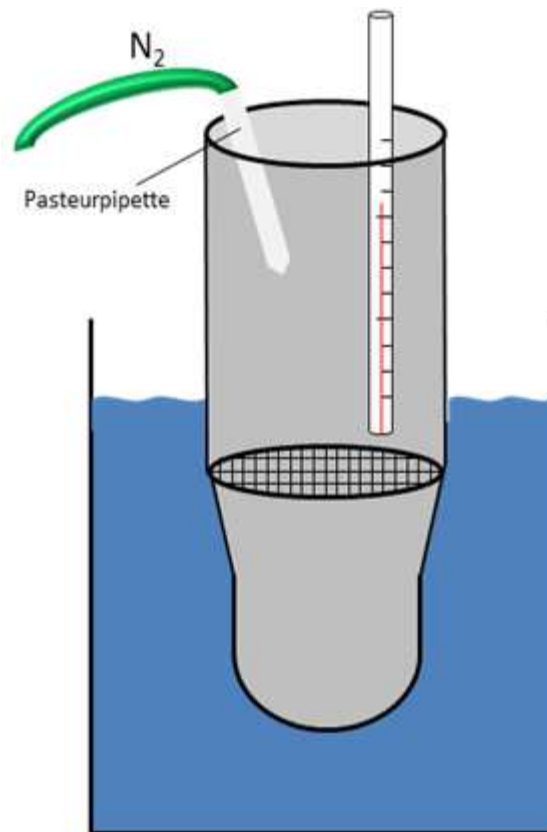


Abbildung 35: Schematische Darstellung der Trockenkammer zur Vortrocknung von *D. geothermalis* im Stickstoffstrom. Ein Zylindrisches Glasgefäß wird in ein Wasserbad getaucht. In dem Zylinder wird ein Gitter verankert damit die Proben dort platziert werden können. Über einen Schlauch wird Stickstoff in die Trockenkammer geführt.

4.8. Rehydratisierung von *D. geothermalis*

Um die Rehydratisierungseffekte zu beobachten, wurden die getrockneten (2 h in der Trockenkammer getrocknet) Proben rehydratisiert. Vorher wurden zur Bestimmung der Rehydratisierungszeit gravimetrische Messungen der Wasseraufnahme durchgeführt. Damit eine reproduzierbare Atmosphäre zur Verfügung stand, wurde ebenfalls die Trockenkammer genutzt. Die getrockneten Proben wurden bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80-90% und einer Wasserbadtemperatur von 55 °C für 30 min rehydratisiert. Dafür wurden drei verschiedene Fluide verwendet (dest. Wasser, deuteriertes Wasser oder physiologisches Wasser).

4.9. Probenpräparation von *D. geothermalis* zur Analyse mittels CLSM

Die Lasermikroskopmessungen wurden mit dem *LSM 510* von der Firma *Zeiss* durchgeführt. Alle zu messenden Proben wurden mit dem *Live/Dead-Kit* angefärbt, um eine grüne (lebend) und rote (tot) Färbung der Bakterien zu erhalten. Dazu wurde die zu untersuchende Probe mit 1 mL partikelfreiem deionisiertem Wasser aufgeschlämmt und 1.5 µL Syto-9 und 1.5 µL Propidiumiodid (1:100) zugegeben. Diese Mischung wurde für 15-20 min inkubiert. Das Propidiumiodid ist zuständig, um die „toten“ Zellen zu identifizieren. Die Totprobe wurde für 30 min mit 70%-iger Propanollösung abgetötet. Anschließend wurde das Propanol abgedampft und die Probe wurde ebenfalls mit dem *Live/dead-Kit* eingefärbt. Durch die Verwendung des in das Mikroskop eingebauten UV-Lasers wurden die fluoreszierenden Farben angeregt und es wurde durch das Okular, welches mit einem Computer verbunden ist, eine Bildgebung möglich. Die Apparatur ist mit verschiedenen Lasertypen ausgestattet:

- Argon-Ionen-UV-Laser (Anregungswellenlängen: 351 und 364 nm)
- Argon-Laser (Anregungswellenlängen: 458, 488 und 514 nm)
- Helium-Neon-Laser (Anregungswellenlängen: 543 und 633 nm)

Das Mikroskop und der Laser wurden über einen PC mit der Software *LSM 510 Release 3.2* von der Fa. *Zeiss* gesteuert. Die zu untersuchenden Bakterien, die mit deuteriertem Wasser rehydratisiert wurden, sind nach der Rehydratisierung für 2 Wochen auf dem R2A-Agar verblieben.

4. Praktische Durchführung

4.10. Analyse mittels AFM

4.10.1. Probenpräparation von *D. geothermalis*

Alle Topographische- und Nanoindentationsversuche wurden mit dem Rasterkraftmikroskop des Typs *NanoWizard* der Firma *JKP Instruments* durchgeführt. Die verwendeten Spitzen bestehen aus Silizium und sind *Non-Contact-/Intermittent-Contact-Mode-Cantilever* vom Typ *NanoWorld Pointprobe NCH* der Firma *NanoWorld*.

Tabelle 6: Technische Daten und Abmessungen der benutzten AFM-Spitzen.

Cantilever Daten	
Dicke	$4 \pm 0.5 \mu\text{m}$
Mittlere Breite	$30 \pm 5 \mu\text{m}$
Länge	$125 \pm 5 \mu\text{m}$
Kraftkonstante	$42 \pm 36 \text{ N/m}$
Resonanzfrequenz	$320 \pm 70 \text{ Hz}$

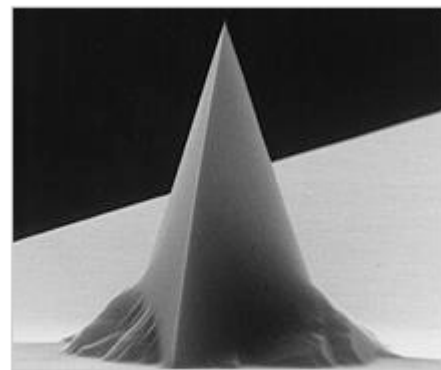


Abbildung 36: REM-Aufnahme einer AFM-NCH Spitze der Firma NanoWorld. [200]

Der Spitzenradius beträgt 8 nm. Bei allen Messungen wurde auf der intermittierende Kontaktmodus verwendet, wobei die Scanrate auf nicht größer als 1 Hz eingestellt wurde. Um äußere Einflüsse stärker abzuschirmen, wurde der Schwingungsisolationstisch *Micro 40* der Firma „Halcyonics GmbH“ verwendet. Es wurden Streifen mit einem Skalpell aus dem Cellulosefilter ausgeschnitten und mit doppelseitigem Klebeband auf einem Objektträger fixiert. Zur Messung der Elastizität wird ein Nanoindentationsversuch durchgeführt und zwischen den verschiedenen Eindrücktiefen variiert. Dabei blieb die Dauer eines Eindruckversuches konstant bei 10 s, einschließlich des Herunter- und Hochfahrens der Spitze.

4.10.2 Probenpräparation von menschlichen Erythrozyten mit bakteriellen Endotoxinen zur Analyse mittels AFM

Es wurde Humanblut mit einer Lösung aus physiologischer Kochsalzlösung und den zu untersuchenden Endotoxinen, das Lipopolysaccharid LPS vom Bakterium *E. coli* und das LPS-RS des Bakteriums *Rhodobacter sphaeroides*, in der Konzentration von $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ versetzt. Diese Lösung wurde für 7 h gelagert. Anschließend wurden die Blutproben auf einem Objektträger ausgestrichen. In einem dritten Experiment wurden beide Lipopolysaccharide in einem Massenverhältnis von 1 : 1 zu einer unbehandelten Blutprobe zugegeben.

4.11. Synthese der multilamellaren Vesikel aus DMPC

Zur Erzeugung von multilamellaren Vesikeln wurde DMPC unter Rühren zuerst in einem großen Überschuss an Chloroform gelöst. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit bidestilliertem Wasser gelöst, sodass eine Endkonzentration von $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ entstand. Die Lösung wurde mit einem Ultraschallgerät des Typs *W-450 D* der Firma *Branson-Digital Sonifier* beschallt. Es wurde eine Amplitude von 15% bei einer Beschallungsdauer von 1 h und einer maximalen Leistung von 100 W (Temperatur $>300 \text{ K}$) eingestellt. In den Fällen, in dem das Endotoxin LPS eingesetzt wurde, ist dieses vor der Ultraschallbehandlung unter leichtem Rühren zuzugeben worden. Es wurden drei verschiedene molare Konzentrationen (0.23 mol-%, 2.5 mol-% und 7.5 mol-%) an LPS *E. coli* verwendet.

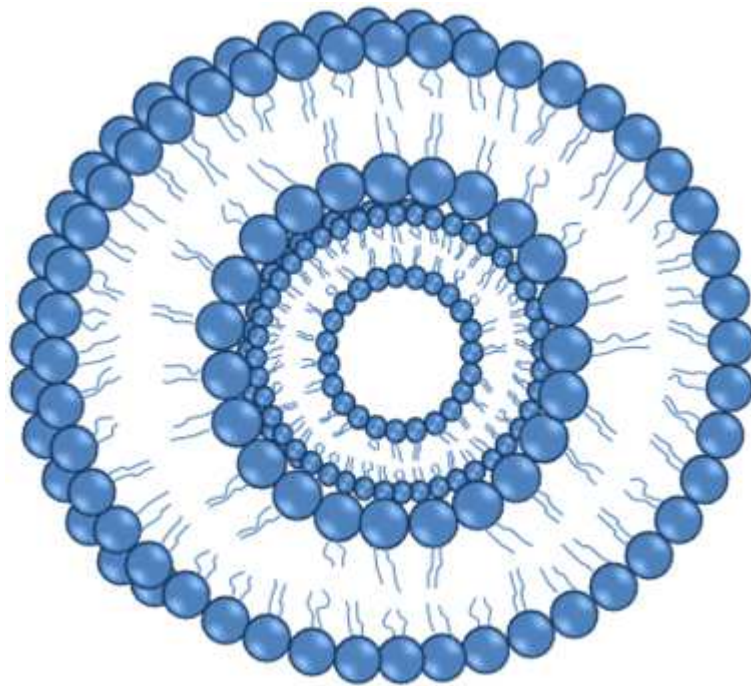


Abbildung 37: Schematische Darstellung eines multilamellaren DMPC-Vesikels.

4.12. Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers der DMPC-Vesikel mit Particle Tracking

Die Ermittlung der hydrodynamischen Durchmesser der DMPC-Vesikel wurde mittels Particle-Tracking durchgeführt. Dazu wurden die Vesikelsuspensionen mit destilliertem Wasser auf 1:100 verdünnt. Aus der Lösung wurden 4-5 Tropfen auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas abgeschlossen. Um eine möglichst dünne Schichtdicke von ca. 3-8 μm zu erhalten, wurde das Deckglas mit einem Gewicht beschwert. Aufgrund der dünnen Schichtdicke war es den Vesikeln damit nur noch möglich in x,y-Richtung Bewegungen auszuführen. Alle vier Kanten des Deckglases wurden mit Wachs versiegelt, um Verdunstung und die damit einhergehende Schichtdickenänderung zu verhindern.

4.13. Messung des Selbstdiffusionskoeffizienten des Lipopolysaccharides

Die Selbstdiffusionskoeffizienten des LPS wurden mit ^1H -PFG-NMR an einem Avance 400 Spektrometer bestimmt. Dazu wurde eine Lösung von $4.0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS hergestellt. Dies repräsentiert dieselbe Konzentration der 0.23 mol-% LPS-Lösungen in den vorherigen DMPC/LPS-Experimenten (Kapitel 4.11.). Dabei wurden zwei Gradientenpulse δ von jeweils $9 \mu\text{s}$ verwendet. Der eingestellte Gradient bewegte sich im Bereich von $G = 33\text{-}600 \text{ G} \cdot \text{cm}^{-1}$. Anschließend wurde 100 mg DMPC- d_{54} -MLV zu der LPS-Lösung hinzugefügt, um eine molare Konzentration von 0.23 mol-% LPS zu erhalten. Es wurde dasselbe stimulated-echo Experiment mit den analogen Parametern durchgeführt.

4.14. Probenpräparation der DMPC-MLVs zur Analyse mittels AFM

Für die AFM-Messungen wurde ein $4 \times 4 \text{ mm}$ großes Siliziumplättchen als Substrat eingesetzt. Auf das Plättchen wurden $10 \mu\text{L}$ der zu untersuchenden Flüssigkeit pipettiert und für 24 h getrocknet. Am AFM wurde der intermittierende Kontaktmodus bei einer Frequenz von 240-270 kHz verwendet. Die Elastizitätsmessungen wurden mit den Nanoindentationsexperimenten durchgeführt, wobei die Spitze des AFM 400 nm über einen Zeitraum von 10 s in Richtung der Probe bewegt wurde.

4.15. Zeta-Potential-Messung

Die Zeta-Potential-Messungen wurden mit einem Zetaziser des Typs *Nano-ZS* der Firma *Malvern Instruments GmbH* durchgeführt. Dazu wurden $700 \mu\text{L}$ der zu untersuchenden Substanz in eine *DTS 1070* Zelle der Fa. Malvern überführt. Es wurden pro Probe drei Messdurchgänge mit jeweils 100 Scans durchgeführt. Die darauffolgende Auswertung wurde mit der *Zetasizer Software* ebenfalls von Malvern getätigt.

4. Praktische Durchführung

4.16. Darstellung der DMPC-Doppelschicht mit und ohne LPS

Zur Präparation der DMPC-Doppelschichten musste die DMPC-Konzentration sehr hoch gewählt werden. In dieser Arbeit wurde ein Massenverhältnis von 1:1 mit dem entsprechenden Puffer eingesetzt. Es wurden 250 mg DMPC in 250 mg Tris-Puffer (10 mM Tris, 10 mM KCl, 0.5 mM EDTA und 140 mM NaCl) suspendiert. Um ein homogenes Gemisch zu erhalten, wurden 10-20 Gefrier-Tau-Zyklen durchlaufen. Ein Gefrier-Tau-Zyklus beginnt mit dem Einfrieren der Probe bei -30 °C. Anschließend wurde die DMPC-Probe langsam bei Raumtemperatur wieder aufgetaut und abermals eingefroren. Es wurden die analogen LPS-Konzentrationen aus Kapitel 4.11. verwendet.

4.17. Festkörper-NMR von DMPC-Doppelschichten

Die ^{31}P -Festkörper-NMR Messungen wurden mit dem *Avance 400* Spektrometer durchgeführt. Dabei wurde ein 4 mm Rotor aus Zirkoniumoxid und der Probenkopf BL4CPMAS verwendet. Aus der folgenden Formel kann das Entkopplerfeld der Protonen bestimmt werden. Es beträgt dabei $\gamma B_2 = 50 \text{ kHz}$. [195–197]

$$\frac{\gamma \cdot B_2}{2\pi} = \frac{1}{4 \cdot t_{90}} \quad (52)$$

Alle Festkörpermessungen wurden ohne Rotation bei einer Temperatur von 310 K durchgeführt. Die erhöhte Temperatur wird durch das Zuströmen von Luft erreicht. Die ^{31}P -Festkörper-Messungen wurden mit einer Hahn-Echo-Sequenz (Kapitel 3.5.1.) unter Protonenentkopplung durchgeführt. Die Pulsweite δ hat in beiden Fällen 11 μs betragen und der Pulsabstand belief sich auf 50 μs . Für die ^2H -Festkörper-NMR Messung wurde ein Festkörper-Echo-Experiment durchgeführt. Dabei wurde die Pulslänge auf 5 μs mit einer Pulsverzögerung von 50 μs eingestellt.

Die hochviskosen DMPC-Doppelschichten wurden in einen normalen 4 mm Rotor aus Zirkoniumoxid gegeben. Durchgeführt wurden die ^{31}P - und ^2H -Festkörper-NMR Messungen an einem 400 MHz Bruker Avance Spektrometer ohne Rotation. Die

Temperatur von 310 K wurde mit einströmendem Brauchgas erzielt. Die ^{31}P -Messungen wurden mit einer Hahn-Echo-Sequenz unter Protonenentkopplung durchgeführt. Die Pulsdauer beider Pulse betrug 11 μs und der Pulsabstand 50 μs .

Für die ^2H -Festkörper-NMR Messung wurde deuteriertes DMPC- d_{54} eingesetzt wobei ein Festkörper-Echo-Experiment durchgeführt wurde. Dabei wurde die Pulslänge auf 5 μs mit einer Pulsverzögerung von 50 μs festgelegt.

4. Praktische Durchführung

4.18. Verwendete Chemikalien

In Tabelle 7 sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und deren Hersteller aufgelistet.

Tabelle 7: Chemikalien die in der Arbeit verwendet werden.

Chemikalie	Hersteller/Bezugsquelle
Acetylcholinchlorid, p. A.	Alfa Aesar
Cadmiumacetat	Fluka
Calciumchlorid-6-hydrat, p. A.	Riedel-de Haën
Deuteriumoxid, 99.9 atom%, p. A.	Aldrich
1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin (DMPC)	TCI chemicals
Eisen(III)-chlorid-6-hydrat, p. A.	Riedel-de Haën
Essigsäureanhydrid, p. A.	Alfa Aesar
Ethanol, p. A.	Sigma-Aldrich
Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Carl Roth
Hydroxylaminhydrochlorid	Alfa Aesar
Kaliumpermanganat	Riedel-de Haën
Lipopolysaccharid <i>Escherichia coli</i>	Sigma-Aldrich
Live/Dead Backlight-Kit	Life technologies
Magnesiumsulfat	Riedel-de Haen Fluka
Natriumalginat	Fluka
Natriumchlorid, p. A.	VWR chemicals
2-Propanol, p. A.	KMF Optichem
Pyridin	Alfa Aesar
Salzsäure	Fisher Scientific
Tris-Puffer	Applichem
Zinkacetat	Chemika

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1. Biophysikalische Systeme unter Stressbedingungen

In der biophysikalischen Forschung werden biologische Systeme auf die Reaktion in Stresssituationen untersucht. Dabei ist „Stress“ für jedes biologische System unterschiedlich definiert. Der Biofilm ist einer Stresssituation ausgesetzt, wenn eine Trockenperiode einsetzt. Dadurch kann ein Wassermangel in der Biofilmmatrix ausgelöst werden. Dazu wurden in den folgenden Kapiteln Experimente an Biofilmen durchgeführt, die einer Trockenperiode ausgesetzt waren. In einem anderen biologischen System der Zellmembranen bedeutet die Einlagerung von nicht-körpereigenen Polymeren, wie den bakteriellen Lipopolysacchariden, eine Stresssituation für die Zelle.

5.2. Wasserspeicherung in der EPS und im Biofilm

5.2.1. Algenalginatgele

5.2.1.1. Acetylierung von Algenalginatgelen

Zur Untersuchung des Einflusses der extrazellulären polymeren Substanzen auf die Wasserspeicherung in einem komplexen System wie einem Biofilm wird Algenalginat als Modell-System eingesetzt. Um die Eigenschaften des bakteriellen Alginat zu simulieren, wurde das Algenalginat acetyliert, weil Algenalginat im Gegensatz zu bakteriellem Alginat keine Acetylgruppen besitzt. [44]

In Abbildung 38 sind zwei ^1H -NMR-Spektren zu sehen. Das Spektrum für das acetylierte Algenalginat (rot) zeigt einen zusätzlichen Peak bei 2.0 ppm gegenüber dem Spektrum des unbehandelten Algenalginats (schwarz). Daraus ist zu erkennen, dass die Acetylierung des Algenalginats erfolgreich war.

5. Ergebnisse und Diskussion

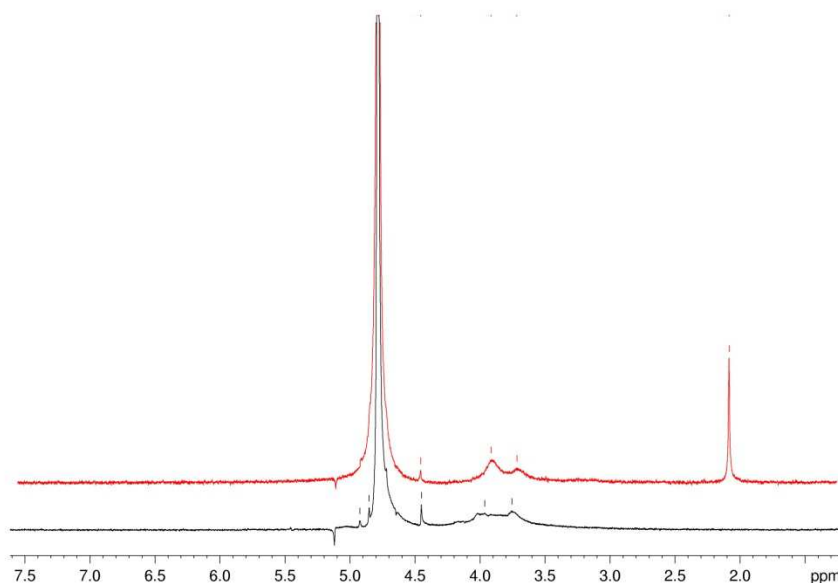


Abbildung 38: Darstellung der ^1H -NMR-Spektren von nicht acetyliertem Alginat (schwarz) und acetyliertem Alginat (rot) in D_2O .

Der Grad der Acetylierung wurde mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie bestimmt. Dabei findet eine Substitutionsreaktion der Acetylgruppe mit dem Hydroxylamin statt (Abbildung 39). Es bildet sich eine sogenannte Hydroxamsäure aus. Diese funktionelle Gruppe gehört zu den tinktogenen Gruppen, die als Beizenfarbstoffe verwendet werden. Durch den Zusatz von eisenhaltigen Lösungen bildet sich ein zyklischer Komplex aus (1 in Abbildung 39), der eine tiefe Rot- bis Violettfärbung hervorruft. [198]

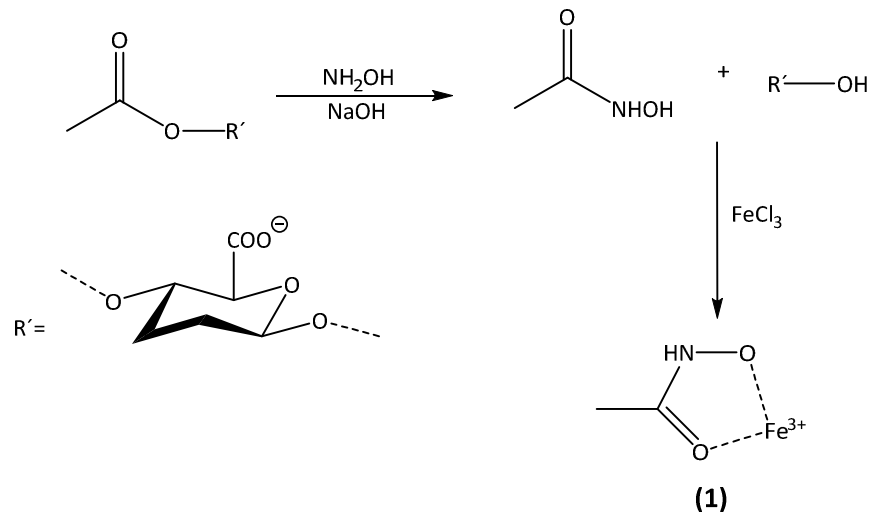


Abbildung 39: Schematische Darstellung der Nachweisreaktion für die Acetylierung und der bei der UV/Vis-Spektroskopie nachweisbare Komplex (1).

Die Referenzprobe, für die ein Acetylierungsgrad von 100% angesetzt wird, wird ebenfalls mit den in Kapitel 4.2. beschriebenen Reagenzien versetzt und im Spektrometer gemessen. Der Grad der Acetylierung des Algenalginats wird über die Absorption von Licht der Wellenlänge 540 nm bestimmt. [192,198] Die UV/Vis-Spektren der acetylierten Algenalginatprobe und der Referenzprobe sind in Abbildung 40 dargestellt.

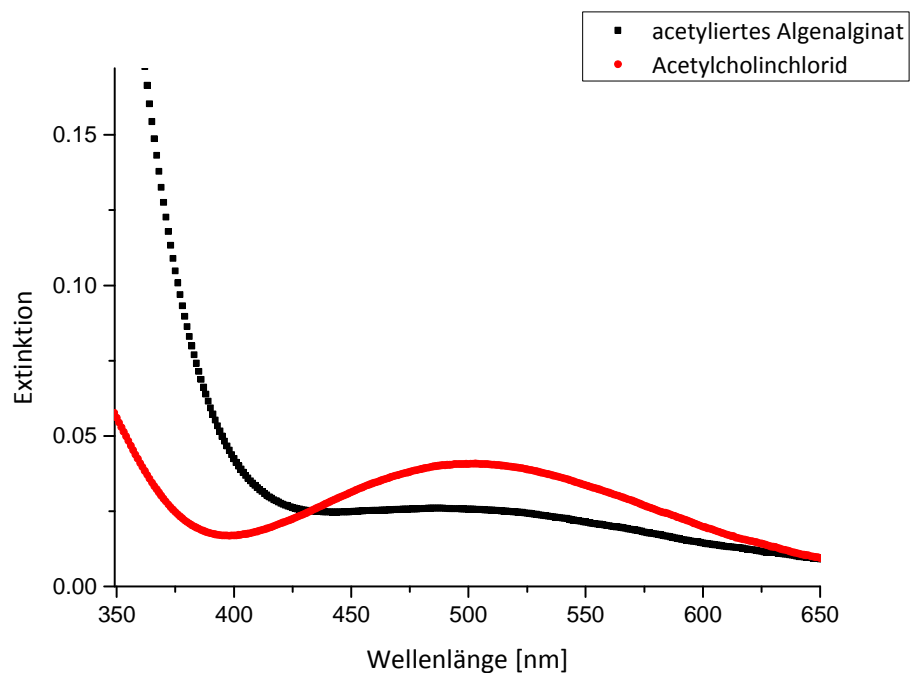


Abbildung 40: Auftragung der UV/Vis-Spektren von acetyliertem Algenalginat (schwarz) und der Referenzprobe Acetylcholinchlorid (rot).

5. Ergebnisse und Diskussion

Die Auswertung des UV/Vis-Spektrums ergibt für die in dieser Arbeit synthetisierten Alginat einen Acetylierungsgrad von 15%. Dieser Prozentsatz entspricht dem Acetylierungsgrad der Alginatmoleküle des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* (V209 strain). [199] Im Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* besitzen die Acetylgruppen die Funktion der besseren Anhaftung an einen Untergrund und für die Bildung der Mikrokolonien im Biofilm. [14,200]

5.2.1.2. Wasserspeicherung in Alginatgelen

Die Wasserspeicherfähigkeit des Algenalginats wurde durch ^2H -PFG-NMR-Messungen (Kapitel 4.3.), die bei Raumtemperatur durchgeführt wurden, ermittelt. Dafür wurden vier verschiedene Algenalginat : D_2O -Konzentrationen (m : m) verwendet. Mit den Stejskal-Tanner-Auftragungen in Abbildung 41, die sich aus den ^2H -PFG-NMR-Spektren ergeben, lassen sich die Selbstdiffusionskoeffizienten der D_2O -Moleküle bestimmen. Aus den Graphen sind für jede Algenalginatkonzentration zwei unterschiedliche Steigungen abzulesen (Abbildung 41). Die Steigung in der Stejskal-Tanner-Auftragung der ^2H -PFG-NMR-Messungen entspricht dem Selbstdiffusionskoeffizienten der D_2O -Moleküle. Da zwei verschiedene Steigungen ausgemacht werden können, sind in diesem Algenalginat : D_2O -System zwei Fraktionen schweres Wasser vorhanden.

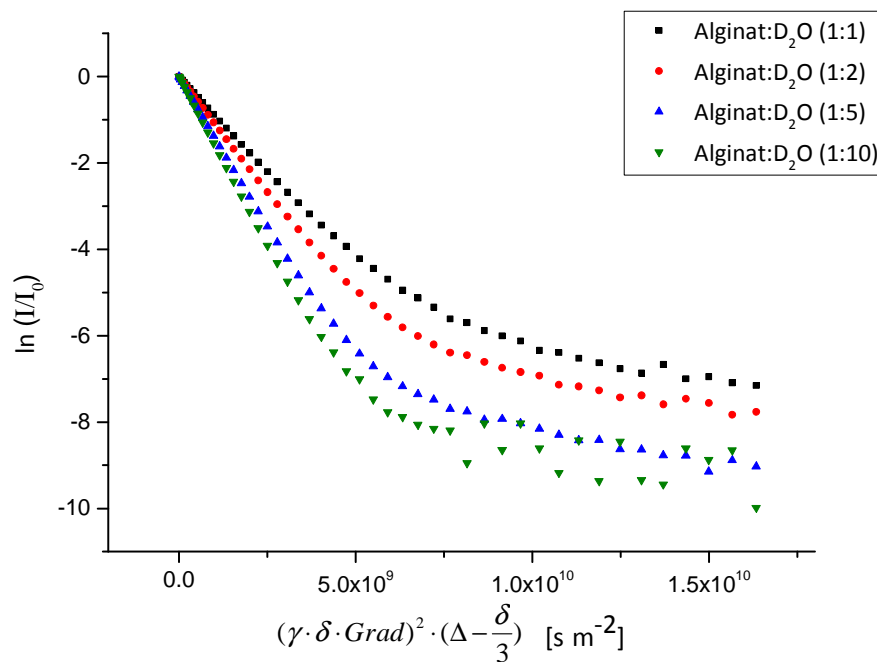


Abbildung 41: Stejskal-Tanner-Auftragungen der ^2H -PFG-NMR-Messungen von D_2O mit unterschiedlichen Konzentrationen von Alginat. Die (1) symbolisiert die schnelle D_2O -Fraktion des grünen Graphen. Durch die (2) wird die langsame D_2O -Fraktion des grünen Graphen angezeigt.

Die Fraktion, die durch die größere Steigung in der Stejskal-Tanner-Auftragung dargestellt wird (1 in Abbildung 41), besitzt einen größeren Selbstdiffusionskoeffizienten und wird im Folgenden als schnelle D_2O -Fraktion bezeichnet. Die größer werdende Steigung in den Stejskal-Tanner-Auftragungen (schwarzer bis grüner Graph in Abbildung 41) ist das Resultat der stärkeren Verdünnung der Alginatgele. Dadurch befinden sich mehr freie D_2O -Moleküle in der Lösung, welche nicht an der Solvatisierung der Alginatmoleküle teilnehmen. Die zweite Fraktion (2 in Abbildung 41), die als langsame D_2O -Fraktion beschrieben wird, besitzt aufgrund der kleineren Steigung dementsprechend auch einen niedrigeren Selbstdiffusionskoeffizienten. Diese zweite Fraktion stellen D_2O -Moleküle dar, die in ihrer Diffusion gehindert sind. Der langsame Selbstdiffusionskoeffizient wird durch eine Art „Bindung“ der D_2O -Moleküle mit dem Polysaccharidnetzwerk erreicht. Diese „Bindung“ hat zwei Ursachen. Zum einen besteht die Bindung aus nicht-kovalenten Wechselwirkungen der D_2O -Moleküle mit den Polymerketten. Zum anderen kann der entropische Effekt, der während der Mischung der Polysaccharide mit dem D_2O auftritt,

5. Ergebnisse und Diskussion

die Bindung der D_2O -Moleküle im Polymernetzwerk erklären. Dabei bewirkt die Aufquellung der Polymermatrix eine Zunahme der Entropie im System. Um die Entropie zu verringern, sprich dem Gel das Wasser zu entziehen, muss Energie in Form von Wärme aufgebracht werden. [201]

Der aus der Auswertung erhaltene Selbstdiffusionskoeffizient der schnellen D_2O -Fraktion hat sich bei Verringerung der Alginatkonzentration dem des reinen D_2O angenähert (Abbildung 42). Die aus den Auswertungen der Stejskal-Tanner-Auftragungen erhaltenen Selbstdiffusionskoeffizienten sind in Abbildung 42 dargestellt. Der Selbstdiffusionskoeffizient der schnellen D_2O -Fraktion steigt von $8.87 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ auf $1.57 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ an und nähert sich dem Diffusionskoeffizienten des reinen D_2O ($1.87 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ bei 25°C). Aufgrund des erhöhten D_2O -Gehaltes in den Alginatgelen ist eine Zunahme der Selbstdiffusionskoeffizienten der schnellen D_2O -Fraktion zu erkennen (Abbildung 42). Daraus lässt sich eine erhöhte Beweglichkeit der D_2O -Moleküle ableiten. Ganz im Gegensatz dazu bleibt der Selbstdiffusionskoeffizient der langsamen D_2O -Fraktion nahezu konstant, wie an dem Verlauf in Abbildung 42 zu sehen ist. Die exakten Datensätze sind in der Tabelle 13 in Kapitel 8 aufgeführt.

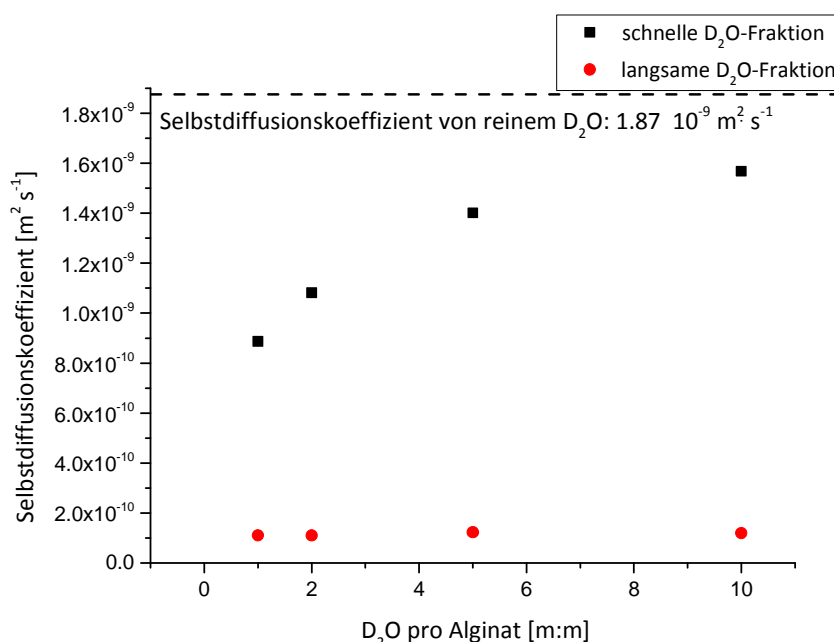


Abbildung 42: Auftragung der Selbstdiffusionskoeffizienten der schnellen und langsamen D_2O -Fraktion innerhalb der Alginatgele verschiedener Konzentrationen gegen die Zunahme an reinem D_2O . Bei der Auftragung stimmt der Massenanteil an D_2O mit dem Alginat: D_2O -Massenkonzentrationsverhältnis überein. Die gestrichelte Linie gibt den Wert des Selbstdiffusionskoeffizienten für reines D_2O bei 25°C an. [202]

Um einen Vergleich zwischen der Wasserspeicherfähigkeit von unbehandeltem Algenalginat und acetyliertem Algenalginat zu ziehen, wurden ^2H -PFG-NMR-Messungen nach Kapitel 4.3. durchgeführt. Damit die Eigenschaft der Wasserspeicherfähigkeit beider Algenalginat verglichen werden kann, wird die Veränderung der Anteile der schnellen und langsamen D_2O -Fraktion innerhalb der EPS-Matrix in Tabelle 8 gegenübergestellt.

Tabelle 8: Wasseranteil in acetylierten und unacetylierten Algenalginatgelen für die schnelle und langsame D_2O -Fraktion.

	Alginate : D_2O [m%]	Anteil der schnellen D_2O -Fraktion	Anteil der langsamen D_2O -Fraktion
nicht acetyliert	1:10	0.965	0.035
acetyliert	1:10	0.989	0.011

Aufgrund der Acetylierung von 15% aller Hydroxid-Gruppen im Algenalginat ist der Anteil der langsamen D_2O -Fraktion um 2.4% gesunken, dafür ist der Beitrag der schnellen D_2O -Fraktion um den analogen prozentualen Wert angestiegen (Tabelle 8). Daraus lässt sich schließen, dass mit einer Acetylierung die Wasserspeicherfähigkeit innerhalb der EPS-Matrix abnimmt. Diese Abnahme der Wasserspeicherfähigkeit von acetylierten Algenalginaten ist durch die hydrophoberen Eigenschaften des Polymers zu erklären. Da hydrophile Hydroxid-Gruppen gegen hydrophobere Ester-Gruppen substituiert wurden, besitzt auch das gesamte Polysaccharid einen hydrophoberen Charakter. Einen direkten Vergleich zu bakteriellem Alginat in Bezug auf den Wasseranteil innerhalb der Gel-Matrix kann dennoch nicht hergestellt werden, da Alginat von Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* im Vergleich zu Algenalginaten keine G-Blöcke enthalten. [14, 200, 203] Dennoch kann auch in einem acetylierten Algenalginat eine zweite Wasserfraktion detektiert werden (Abbildung 43 links).

5. Ergebnisse und Diskussion

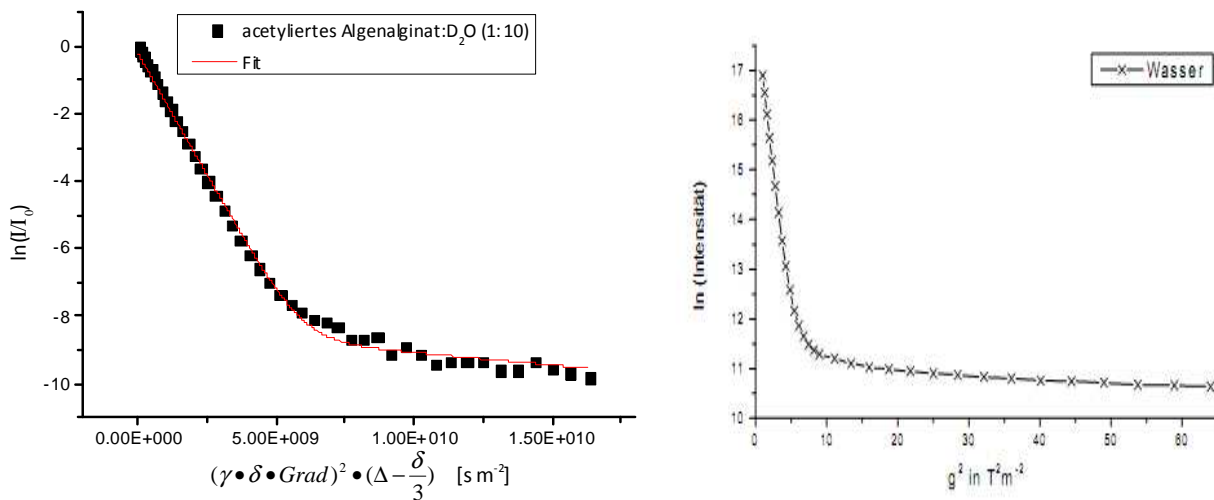


Abbildung 43: Vergleich der Stejskal-Tanner-Auftragungen eines acetylierten Algenalginatgels (links) und der eines Biofilms des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa*, welches bakterielles Alginat als Bestandteil der EPS besitzt (rechts) [202]. Die (1) symbolisiert die schnelle D₂O-(links) und die schnelle H₂O-Fraktion (rechts). Durch die (2) wird der Bereich der langsamen Fraktion von D₂O (links) und H₂O (rechts) angezeigt.

M. Vogt zeigte in seiner Dissertation, dass in dem Biofilm des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* zwei unterschiedliche Wasserfraktionen ausgemacht werden können. [201] Diese beiden Wassertypen sind in Abbildung 43 (rechts) mit (1) für die schnelle D₂O-Fraktion und (2) für die langsame D₂O-Fraktion gekennzeichnet. Auch in der Stejskal-Tanner-Auftragung des acetylierten Algenalginats werden zwei verschiedene Wasserarten, durch zwei unterschiedliche Steigungen detektiert (Abbildung 43 links). Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass Algenalginat als Modellsystem für die Wechselwirkung von Wasser mit der EPS von Bakterien eingesetzt werden kann. Ein Vergleich der Diffusionskoeffizienten beider Experimente in Abbildung 43 würde keine weiteren Erkenntnisse bringen, da deuteriertes Wasser aufgrund des Isotopeneffektes eine langsamere rotatorische und translatorische Bewegung besitzt. Daher hat D₂O einen um 23% kleineren Diffusionskoeffizienten als H₂O. [204]

5.2.2. Wasserspeicherung im Biofilm von *D. geothermalis*

5.2.2.1. Trocknungsversuche an Biofilmen von *D. geothermalis*

In trockenen Gebieten auf dieser Erde sind Biofilme täglich der extremen Stresssituation des Wassermangels ausgesetzt. Dabei schützt sich eine Bakterienkolonie gegen die Austrocknung, indem der Biofilm durch die Speicherung von Wasser in seiner Matrix einer Trockenperiode entgegenwirkt. Nachdem die einfache Ausführung eines Biofilm-Systems anhand des Alginats untersucht wurde (Kapitel 5.2.1.), wird im Folgenden die Trocknung einer komplexen Matrix eines intakten Biofilms genauer erforscht. Zu diesem Zweck wurden TGA-Experimente, wie in Kapitel 4.5. beschrieben, mit dem Bakterium *D. geothermalis* durchgeführt. In Abbildung 44 sind die Thermogramme von zwei unbehandelten Biofilmproben dargestellt.

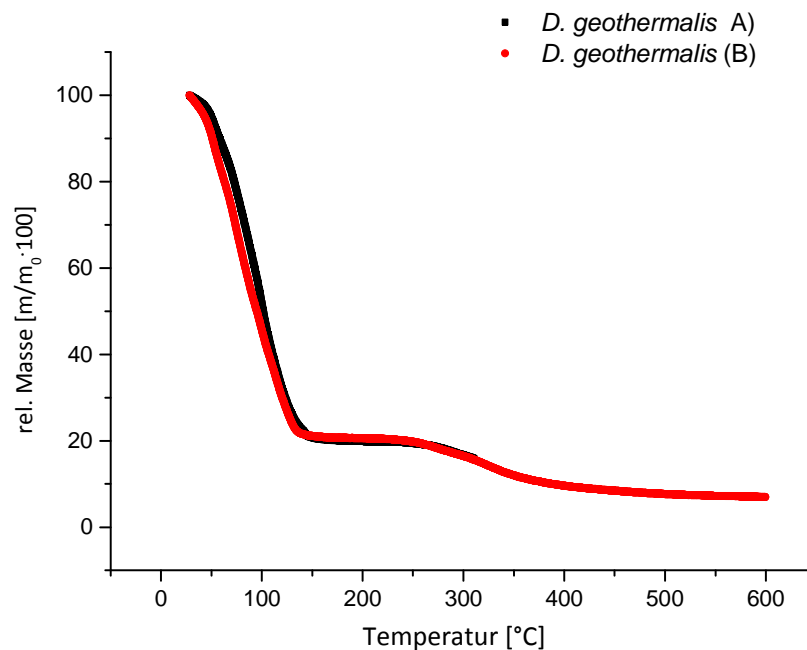


Abbildung 44: Darstellung der Thermogramme zweier unbehandelter *D. geothermalis*-Proben. Die relativen Massen sind dabei gegen die Temperatur aufgetragen. (1) und (2) symbolisieren die Bereiche der Gewichtskonstanz.

5. Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 44 ist der relative Masseverlust von zwei Biofilmpuben derselben Agarplatte gegen die Temperatur im TGA-Ofen aufgetragen. Da in dieser Arbeit mit lebenden Bakterien gearbeitet wurde und bei biologischen Systemen nicht alle Parameter, wie EPS-Konzentration, vollständig reproduzierbar sind, treten bei den Experimenten Messunsicherheiten auf. Eine Verdeutlichung dieser Messunsicherheiten wird beispielhaft in den TGA-Thermogrammen in Abbildung 44 dargestellt. Dieser Unterschied spiegelt sich in dem ersten Temperaturbereich, der sich bis 125 °C erstreckt, wider. Das Wasser tritt aus der EPS-Matrix des Biofilms aus und verdunstet. Die Differenz der Steigungen ist auf Konzentrationsunterschiede an extrazellulären polymeren Substanzen in der Biofilm-Matrix zurückzuführen. Wie aus Abbildung 44 ersichtlich wird, ist bei dem Masseverlust, aufgrund der Wasserverdunstung, zu beobachten, dass sich der gesamte Wasseranteil in dem Biofilm nicht verändert. In beiden Messungen ist ein Verlust an relativer Masse, bis zur ersten Gewichtskonstanz (1 in Abbildung 44), von 80% zu verzeichnen. Des Weiteren ist zu erkennen, dass eine Temperatur von über 100 °C notwendig ist, um das Wasser vollständig aus dem Biofilm zu entfernen und eine erste Gewichtskonstanz (1) im Thermogramm zu erzeugen. Aufgrund des hohen Salzgehaltes und der gelösten Polymere im Wasser kommt es zu einer Siedepunktserhöhung des im Biofilm gebundenen Wassers. Bis zu einer Temperatur von 250 °C ist keine mit der TGA detektierbare Massenveränderung feststellbar. Oberhalb dieser Temperatur findet die Pyrolyse des Biofilms bis zur erneuten Gewichtskonstanz (2 in Abbildung 44) statt, die nichts mehr mit der Wasserverdunstung zu tun hat.

Um die Verdunstung des Wassers exakter untersuchen zu können, wurden nach Kapitel 4.6. Isothermalmessungen der dynamischen Differenzkalorimetrie (DSC) durchgeführt. Der Verlauf des Wärmestroms während einer DSC-Isothermalmessung mit dem Bakterium *D. geothermalis* auf Cellulosefilter ist in Abbildung 45 dargestellt.

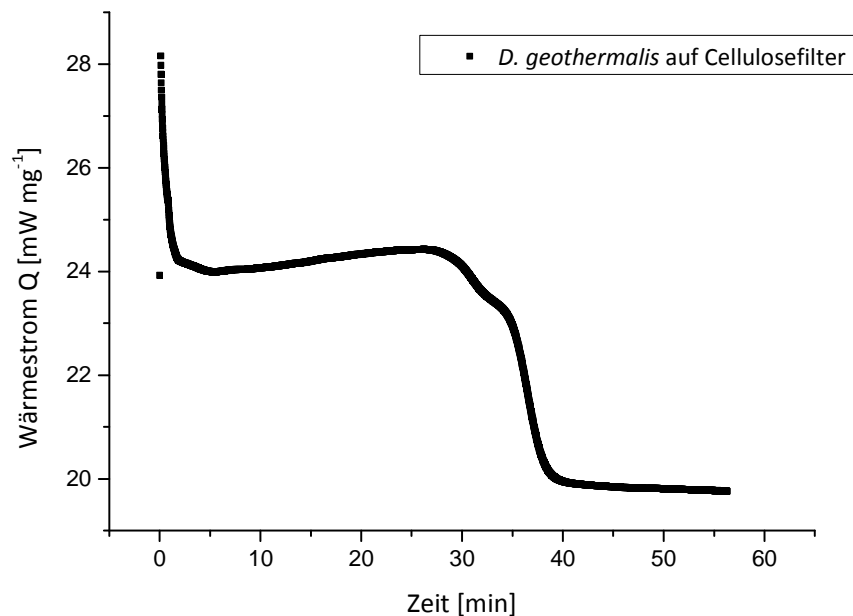


Abbildung 45: Auftragung des Wärmestroms gegen die Trocknungszeit aus der dynamischen Differenzkalorimetrie von *D. geothermalis* auf Cellulosefilter gewachsen bei einer Temperatur von 30 °C. Die Zahlen 1-4 symbolisieren die vier Phasen der Trocknung innerhalb des Biofilms. Zuerst verdunstet das Wasser konstant aus dem Biofilm (1). Anschließend bildet sich eine Schutzhaut bestehend aus EPS aus, wodurch der Wärmestrom abnimmt (2). In der dritten Phase (3) beginnen sich Risse in der Schutzhaut zu bilden und das Absinken des Wärmestroms wird verzögert. Zum Schluss ist alles Wasser aus dem Biofilm verdunstet und der Wärmestrom bricht komplett ein (4).

In Abbildung 45 ist der Wärmestrom der dynamischen Differenzkalorimetrie gegen die Zeit aufgetragen. In den ersten 5 min findet in der DSC eine Equilibrierung statt. Bei der Trocknung eines Biofilms können vier unterschiedliche Bereiche differenziert werden (1 - 4 in Abbildung 45). Der konstant verlaufende Wärmestrom (1) gibt an, dass Wasser kontinuierlich aus dem Biofilm verdunstet und dafür sorgt, dass die lokale Konzentration an EPS-Molekülen im Biofilm ansteigt. Diese Wasserfraktion wird als „freies“ Wasser bezeichnet. Eine weitere Trocknung des Biofilms bewirkt eine Abnahme des Wärmestroms (2), was dafür spricht, dass die Verdunstung des Wassers stark eingeschränkt wird. Diese Abnahme der Wasserverdunstung kann als erster Hinweis auf die Ausbildung einer sich bildenden Schutzhaut interpretiert werden. Die Ausbildung einer Schutzhaut infolge einer Trockenperiode wurde bereits von H.-C. Flemming und J. Wingender 2001 beschrieben. [23] Dabei wird die Oberfläche des Biofilms von Wasser befreit, indem das restliche in der Matrix verbliebende Wasser

5. Ergebnisse und Diskussion

über Kapillareffekte in das Innere des Biofilms gezogen wird. An der Oberfläche des Biofilms werden die Polymere verdichtet, sodass ein Verdunsten des Wassers deutlich erschwert wird. [205] In der dritten Phase (3) der Trocknung des Biofilms verlangsamt sich das Absinken des Wärmestroms nochmal für eine kurze Zeitspanne. Das Abflachen des sich absenkenden Wärmestroms ist mit der Verdunstung einer zweiten Wasserkomponente gleichzusetzen. Dieser zweite Wassertyp ist länger in der EPS-Matrix gebunden und dient dem Biofilm als Wasserreservoir in einer Trockenperiode. Diese Wasserart wird im Folgenden als „gebundenes“ Wasser bezeichnet. Zum Schluss der Trocknung (4) ist das Wasser vollständig aus dem Biofilm verdunstet, und der Wärmestrom fällt stark ab.

Um den Abschnitt des gebundenen Wassers deutlicher aus den differenzkalorimetrischen Messungen herauszustellen, wurden die Biofilme wie in Kapitel 4.7. beschrieben vorgetrocknet. Diese Vortrocknung diente zur Verdunstung der ersten Phase (1) aus Abbildung 46, um etwaige Wechselwirkungen mit dem „gebundenen“ Wasser auszuschließen. Der Verlauf des Wärmestroms ist bei allen Stickstoffströmen ($125 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $250 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ und $500 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) in der Vortrocknung nahezu identisch, daher wird für die Diskussion nur der Verlauf des $250 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ Experimentes gezeigt ($125 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ und $500 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ sind in Kapitel 8. abgebildet). In Abbildung 46 werden drei Vortrocknungszeiten des $250 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ Stickstoffvolumenstroms dargestellt.

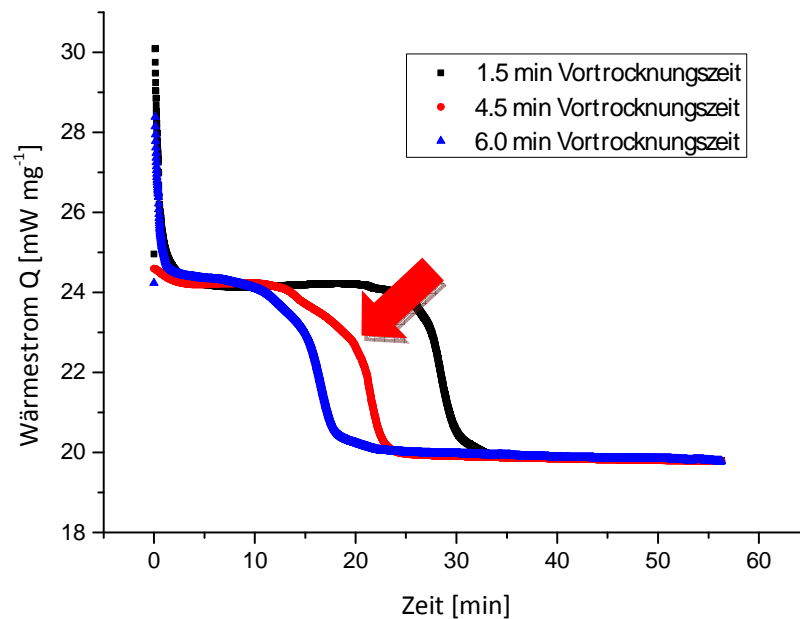


Abbildung 46: Wärmestrom der DSC-Isothermalmessung von *D. geothermalis* auf Cellulosefilter gewachsen mit unterschiedlichen Vortrocknungszeiten bei 30 °C. Der Volumenstrom des Stickstoffs in der Trockenkammer hat $250 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ betragen.

Durch die Vortrocknung in der Trockenkammer (Kapitel 4.7.) wurde die Messzeit im Vergleich zur unbehandelten Biofilmprobe verkürzt (vgl. Abbildung 45 und 46). Das „freie“ Wasser (Abschnitt 1 in Abbildung 45) verdunstet aus dem Biofilm und die zweite Komponente, das „gebundene“ Wasser kann in den dynamischen Differenzkalorimetriemessungen nachgewiesen werden. Das „gebundene“ Wasser, Abschnitt 3 aus Abbildung 46, konnte durch die Vortrocknungszeiten nicht deutlicher gemacht werden. Dennoch ist zu erkennen, dass durch die Vortrocknungszeit das „gebundene“ Wasser nicht verdunstet ist, da es noch in den Isothermalmessungen nachgewiesen werden kann (roter Pfeil in Abbildung 46). Dieses Ergebnis ist ein weiterer Hinweis darauf, dass diese Wasserfraktion stärker in der EPS-Matrix des Biofilms gebunden ist.

Zur genaueren Bestimmung des Anteils des „gebundenen“ Wassers am gesamten Wasseranteil im Biofilm wurden Thermalmessungen der dynamischen Differenzkalorimetrie, wie in Kapitel 4.6. beschrieben, durchgeführt. Damit die beiden Wasserspezies genauer voneinander separiert werden können, wurden mit der

5. Ergebnisse und Diskussion

dynamischen Differenzkalorimetrie die Schmelzpunkt des „freien“ und des „gebundenen“ Wassers bestimmt. In Abbildung 47 sind Ausschnitte der Thermogramme für die ersten fünf Aufheizzyklen der Thermalmessungen dargestellt. Die Thermalmessungen wurden in Zyklen gefahren. Das bedeutet, dass die Proben als erstes in der DSC abgekühlt und dann mit der festgelegten Heizrate von $10\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$ auf die Endtemperatur aufgeheizt wurden. Anschließend wurden die Bakterien mit einer höheren Rate abgekühlt, um die sich bildenden Kristalle in dem Biofilm möglichst klein zu halten, um den Bakterien nicht zu schaden.

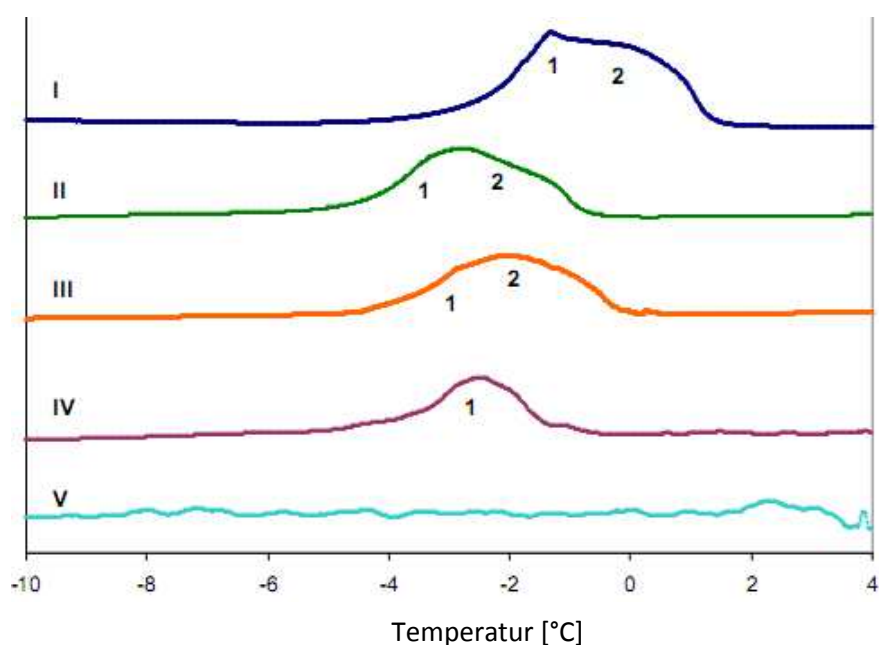


Abbildung 47: Darstellung der Thermalmessungen aus der dynamischen Differenzkalorimetrie mit dem Bakterium *D. geothermalis* auf Cellulosefilter gewachsen. Dabei ist der Wärmestrom Q ist gegen die Temperatur aufgetragen. Die römischen Zahlen (I-V) beschreiben in welchem Aufheizzyklus sich die Probe befindet. Die arabischen Ziffern stellen die beiden zu untersuchenden Wasserfraktionen dar. (1) symbolisiert das „gebundene“ Wasser und (2) das „freie“ Wasser.

In Abbildung 47 sind nur die Aufheizkurven der Thermalmessungen aufgetragen, da die Abkühlkurven aufgrund der höheren Abkühlrate keinen eindeutigen Trend zeigen. Mit den Ziffern I–V sind die Durchgänge der jeweiligen Aufheizkurve benannt. Dabei wurde die Probe von -10 °C auf $+4\text{ °C}$ aufgeheizt. Dies entspricht der ersten Aufheizkurve (I) in Abbildung 47. Nach anschließender Abkühlung auf -10 °C wurde erneut auf $+4\text{ °C}$ aufgeheizt, wodurch Aufheizkurve (II) entstanden ist. Die anderen

Aufheizkurven (III-IV) wurden durch analoge Abkühlungs- und Aufheizzyklen erreicht. Aus Abbildung 47 können zwei verschiedene Wasserfraktionen identifiziert werden. Unter der Berücksichtigung, dass Nakamura et al. [206] in einem Polysaccharidgel ebenfalls zwei Wasserfraktionen gefunden haben, können die beiden Bereiche wie folgt interpretiert werden. Die in der Abbildung 47 mit 1 gekennzeichnete Fraktion ist der bereits beschriebene „gebundene“ Wasseranteil im Biofilm. Dementsprechend veranschaulicht die 2 das „freie“ Wasser innerhalb der Matrix. Im ersten Aufheizzyklus (I) können zwei Wasserfraktionen ermittelt werden. Das „freie“ Wasser (2) schmilzt bei einer Temperatur von ca. 0 °C. Der Schmelzpunkt des „gebundenen“ Wassers (1) liegt 2.21 °C unter dem des reinen Wassers. Aufgrund der intermolekularen nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen dem „gebundenen“ Wasser und den EPS-Molekülen und den in dieser Wasserfraktion gelösten Salzen liegt der Schmelzpunkt dieser Wasserfraktion unter 0 °C. Es wird von einer Gefrierpunktniedrigung ΔT gesprochen. [93]

$$\Delta T = \frac{R \cdot T^2}{\Delta H} \cdot M_1 \chi_A \quad (53)$$

χ_A = Molenbruch der Komponente A

M_1 = Molmasse des Lösungsmittels

T = Gefrierpunkt des reinen Lösungsmittels

ΔH = Schmelzenthalpie des reinen Lösungsmittels

Durch das kontinuierliche Aufheizen der Probe auf +40 °C in den verschiedenen Zyklen ist in Abbildung 47 ein Schrumpfen des „freien“ Wasseranteils (2) zu beobachten. Diese Wasserfraktion verdunstet als erstes aus dem Biofilm und ist im vierten Zyklus (IV) nicht mehr zu detektieren. Das stärker in der Gel-Matrix „gebundene“ Wasser ist erst aufgrund der Wechselwirkungen mit den EPS-Molekülen im fünften Zyklus (V) nicht mehr nachweisbar. Eine weitere Beobachtung ist, dass ab dem zweiten Zyklus eine erneute Schmelzpunktniedrigung beider Fraktionen stattfindet. Das ist ein Hinweis auf die Reaktion der Bakterien innerhalb des Biofilms. Einerseits kann das auf das Erinnerungsvermögen und den Selbsterhaltungstrieb der Bakterien zurückzuführen sein. Roberson und Firestone beschrieben 1992 das

5. Ergebnisse und Diskussion

Verhalten eines Biofilms der *Pseudomonas*-Gattung bei der Trocknung. [207] Sie zeigten, dass es zu einer erhöhten EPS-Produktion in dem Biofilm kommt, um mehr Wasser für Trockenzeiten zu speichern. Allerdings konnten die Effekte der gesteigerten EPS-Produktion erst nach einigen Tagen nachgewiesen werden. Daher wird der Ursprung der erneuten Gefrierpunktserniedrigung ein anderer sein. Durch die Aufheizzyklen verdunstet das „freie“ Wasser zum großen Teil bereits im ersten Zyklus (Abbildung 47), sodass im zweiten Durchgang weniger Wasser im Biofilm vorhanden ist. Die EPS- und Salzkonzentration im Biofilm bleibt allerdings konstant. Daher steigt die Konzentration an gelösten Polymeren und Salzen in dem noch vorhanden kleinen Anteil an „freiem“ und „gebundenem“ Wasser. Der Molenbruch χ_A der Salzkonzentration aus Gleichung 53 nimmt zu, wodurch die erneute Gefrierpunktserniedrigung ΔT im zweiten Zyklus zu erklären ist. In den nächsten Zyklen finden keine weiteren Gefrierpunktserniedrigungen mehr statt, da nach dem ersten Durchgang nicht mehr so viel Wasser im Biofilm vorhanden ist und damit auch im Verhältnis nicht mehr so viel verdunsten kann, um einen Effekt auf die Schmelzpunkte der beiden Wasserspezies zu haben.

Um Aussagen über das nach der Vortrocknung im Biofilm verbliebene Wasser zu machen, sind die Änderungen der Verdampfungsenthalpie $\Delta_v H$ während der isothermalen DSC-Messungen mit Gleichung 5 berechnet worden, und für alle Stickstoffvolumenströme in der Trocknungskammer mit den jeweiligen Vortrocknungszeiten in den Abbildung 48-50 dargestellt.

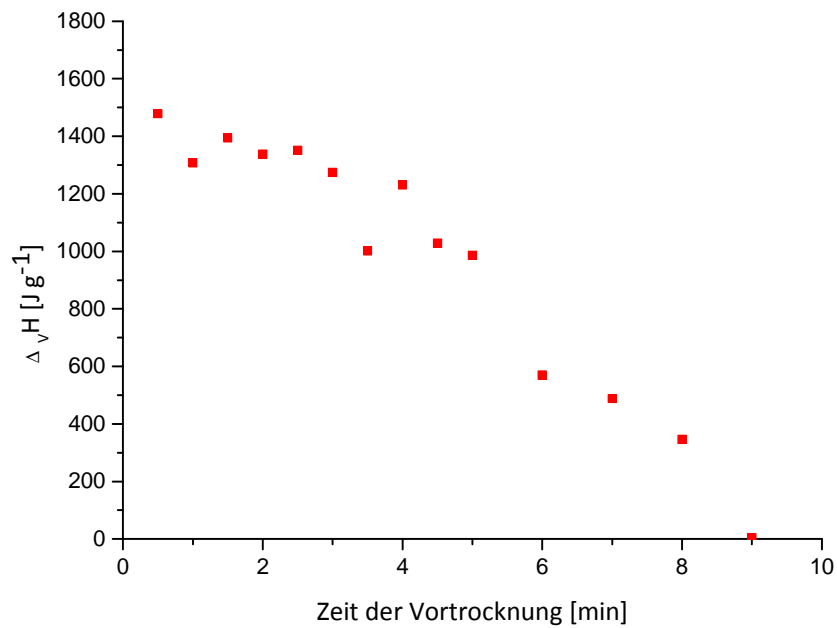


Abbildung 48: Darstellung der Änderung der Verdampfungsenthalpie der Biofilmproben mit verschiedenen Vortrocknungszeiten bei einem Stickstoffstrom von $500 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Ermittelt wurden die Daten aus der Integration der Isothermalmessungen der dynamischen Differenzkalorimetrie.

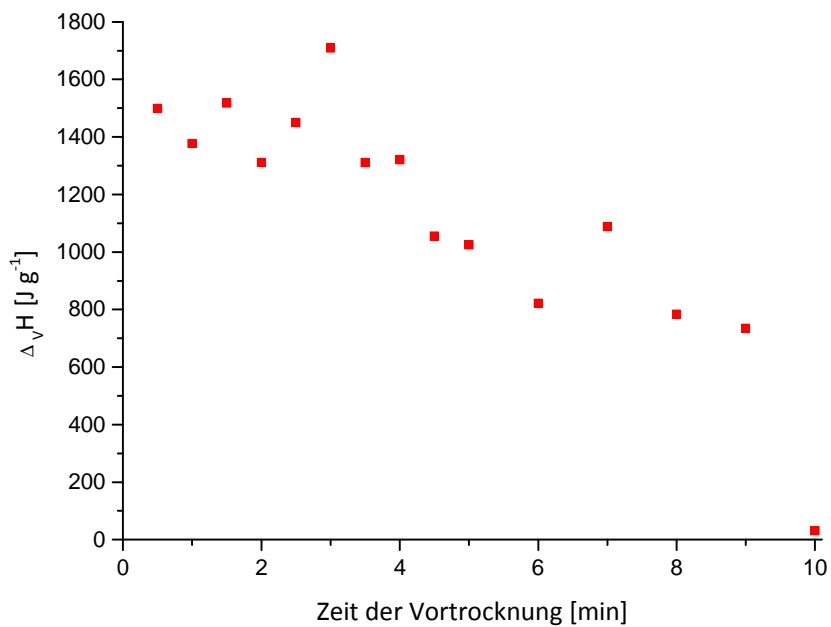


Abbildung 49: Darstellung der Änderung der Verdampfungsenthalpie der Biofilmproben mit verschiedenen Vortrocknungszeiten bei einem Stickstoffstrom von $250 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Ermittelt wurden die Daten aus der Integration der Isothermalmessungen der dynamischen Differenzkalorimetrie.

5. Ergebnisse und Diskussion

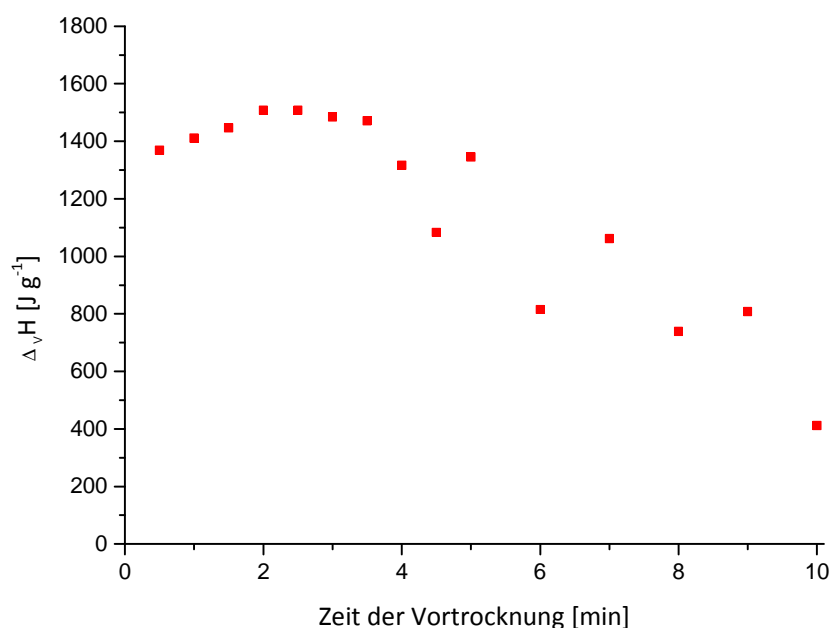


Abbildung 50: Darstellung der Änderung der Verdampfungsenthalpie der Biofilmproben mit verschiedenen Vortrocknungszeiten bei einem Stickstoffstrom von $125 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Ermittelt wurden die Daten aus der Integration der Isothermalmessungen der dynamischen Differenzkalorimetrie.

Die errechneten Werte der Änderung der Verdampfungsenthalpie $\Delta_v H$ sind bei allen Messungen (Abbildung 48 - 50) positiv. Daraus lässt sich ableiten, dass die Vorgänge während der DSC-Isothermalmessungen sich auf den endothermen Prozess der Verdunstung zurückführen lassen. Bei einem Vergleich der drei Darstellungen (Abbildung 48 - 50) wird offensichtlich, dass der Volumenstrom der Vortrocknung Einfluss auf den Verlauf der Enthalpiewerte hat. Bei einem Stickstoffvolumenstrom von $500 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (Abbildung 48) sinken die Enthalpiewerte mit zunehmender Trocknungszeit linear ab. Dieser Vorgang ist auch bei der Vortrocknung mit einem Volumenstrom von $250 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (Abbildung 49) auszumachen. Allerdings sinken die Enthalpiewerte in Abbildung 48 mit $166 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und in Abbildung 49 mit $125 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Durch den stärkeren Volumenstrom kann in derselben Vortrocknungszeit mehr Wasser aus dem Biofilm verdunsten. Daher sinken die Enthalpiewerte für den $500 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ Volumenstrom schneller als die des $250 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Aufgrund der ansteigenden Vortrocknungszeit der Biofilmproben befindet sich weniger Wasser in der zu untersuchenden Probe. Daher ist auch eine geringere Menge Wasser

Wasser für die Verdunstung vorhanden, womit sich das allgemeine Sinken der Enthalpiewerte erklären lässt. Die Änderung der Enthalpiewerte des $125 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ Stickstoffvolumenstroms (Abbildung 50) spiegelt einen anderen Verlauf wider. Bis zu einer Vortrocknungszeit von 3.5 min verändern sich die Werte nur marginal. Erst bei weiterer Trocknung sinken die Enthalpiewerte. Dieses Verhalten ist ein weiteres Indiz für die Existenz einer sich bildenden Schutzhaut. Der Volumenstrom ist so gering, dass der Biofilm augenblicklich auf die Trockenheit reagieren kann. In dem Biofilm bewirkt der Volumenstrom von $125 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ eine sofortige Ausbildung der schützenden Haut auf der Oberfläche.

5.2.2.2. Rehydratisierung von getrockneten Biofilmen

Nach einer Trockenperiode steht dem Biofilm in der Natur Wasser in Form von natürlichem Niederschlag zur Verfügung. Um dieses Szenario zu simulieren wurden in dieser Arbeit Rehydratisierungsversuche mit den *D. geothermalis* Kolonien, wie in Kapitel 4.8. beschrieben, durchgeführt. Um analoge Verhältnisse bei den Rehydratisierungsversuchen zu gewährleisten, wurde der Biofilm vor der Rehydratisierung bis zur Trockenheit in der Trocknungskammer (Kapitel 4.7.) vorgetrocknet. Der Zeitpunkt der vollkommenen Trockenheit des Biofilms ist mit Hilfe der Isothermalmessungen des TGA bestimmt worden (Abbildung 51).

5. Ergebnisse und Diskussion

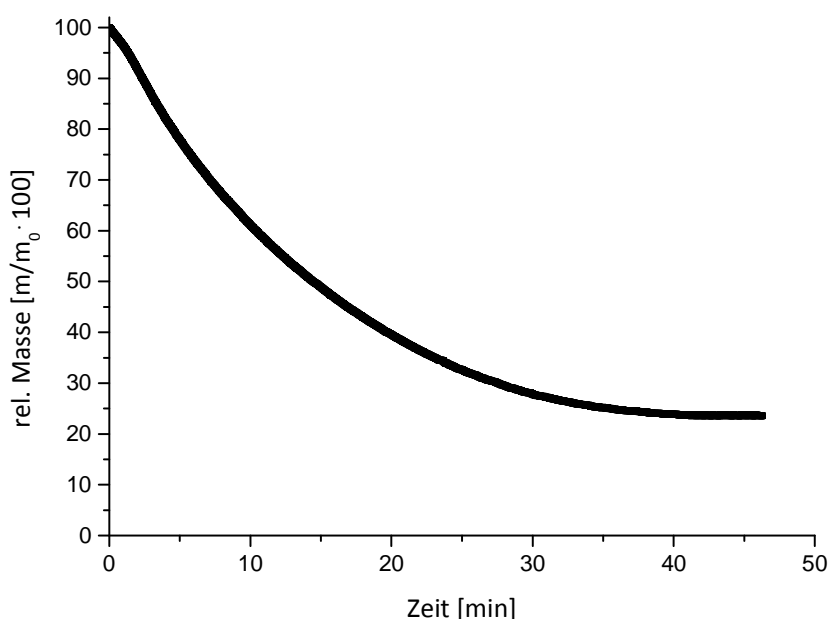


Abbildung 51: Auftragung der relativen Masse eines *D. geothermalis* Biofilms während einer Isothermalmessung in der thermogravimetrischen Analyse gegen die Trocknungszeit bei einer Temperatur von 30 °C.

In Abbildung 51 ist ein Thermogramm einer isothermalen TGA-Messung dargestellt. Die Biofilmprobe wurde bei 30 °C in der TGA getrocknet. Es ist zu erkennen, dass ein Biofilm des Bakteriums *D. geothermalis* mit einem Startgewicht von 10 mg nach 40 min die Gewichtskonstanz in der thermogravimetrischen Messung erreicht. Um auszuschließen, dass sich noch Wasser in der Probe befindet und eine vollständige Trockenheit in der Biofilmprobe erhalten wird, wird die Trocknungszeit in der Trocknungskammer vor der Rehydratisierung auf 2 h festgelegt (vgl. Kapitel 4.8.).

Zur Beurteilung der aufgenommenen Wassermenge während der Rehydratisierung wurde eine gravimetrische Bestimmung, wie in Kapitel 4.8. beschrieben, der Wasseraufnahme durchgeführt. Für die Rehydratisierung ist die Trockenkammer (siehe Kapitel 4.7.) verwendet worden. Die Temperatur des äußeren Wasserbades in der Trocknungskammer ist auf 55 °C eingestellt worden, sodass eine relative Luftfeuchtigkeit von nahezu 95% in der Kammer erzeugt wurde. Die Auswertung dieses Experimentes ist in der Abbildung 53 graphisch aufgetragen.

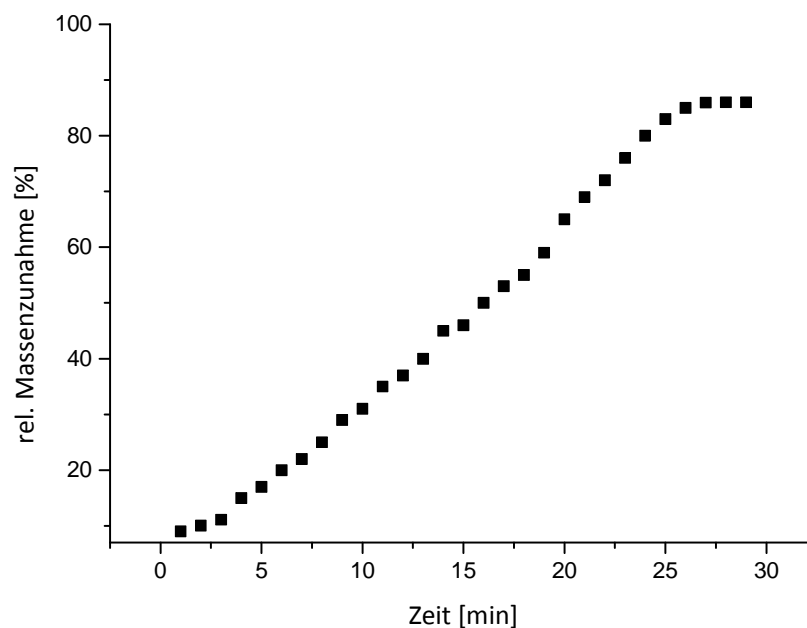


Abbildung 52: Gravimetrische Bestimmung der Wasseraufnahme von *D. geothermalis* bei der Rehydratisierung mit destilliertem Wasser.

In Abbildung 52 ist der Anstieg der relativen Masse einer Biofilmprobe aufgrund der Rehydratisierung mit destilliertem Wasser gegen die Rehydratisierungszeit aufgetragen. Nach einer Rehydratationszeit von ca. 30 min tritt eine maximale Sättigung des Biofilms ein. Die Masse des Biofilms hat sich um ca. 85%, durch die Aufnahme des destillierten Wassers, erhöht. Somit wurde 5% mehr Wasser aufgenommen, als der Biofilm in den ersten Trocknungen (Abbildung 44) abgegeben hat. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Schutzhaut bei der Rehydratisierung aufgeweicht werden muss und dafür mehr Wasser aufgenommen werden muss. Die Rehydratisierung ist, wie in Kapitel 4.8. beschrieben, mit drei unterschiedlichen Wasserarten vollzogen worden.

- destilliertes Wasser
- physiologisches Wasser ($0.14 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl-Lösung)
- deuteriertes Wasser

Diese drei unterschiedlichen Wassersorten wurden gewählt, um die Wasserspeicherung des Biofilms zu untersuchen. Es wurde zum einen destilliertes

5. Ergebnisse und Diskussion

Wasser verwendet, um keine zusätzlichen Salze in den Organismus einzutragen, welche Siedepunktserhöhungen der Wasserfraktionen herbeiführen können. Zum anderen wurde die Rehydratisierung mit physiologischem Wasser durchgeführt, um etwaige Probleme des Biofilms bei der Einlagerung von destilliertem Wasser zu beobachten. Des Weiteren ist deuteriertes Wasser als Flüssigkeitsquelle bei der Rehydratisierung verwendet worden. Diese Flüssigkeit wurde für die Rehydratisierungsversuche benutzt, um zu überprüfen, ob der Biofilm auch deuteriertes Wasser in seiner Gel-Matrix speichern kann. Diese Erkenntnis über die mögliche Speicherung von deuteriertem Wasser in der Biofilmmatrix wird in den späteren ^2H -PFG-NMR-Experimenten untersucht.

In den Thermogrammen (Abbildung 53) der rehydratisierten Biofilmproben ergeben sich deutliche Unterschiede in der Wasserabgabe. Als Blindprobe dient destilliertes Wasser, welches pur in der TGA erhitzt wurde.

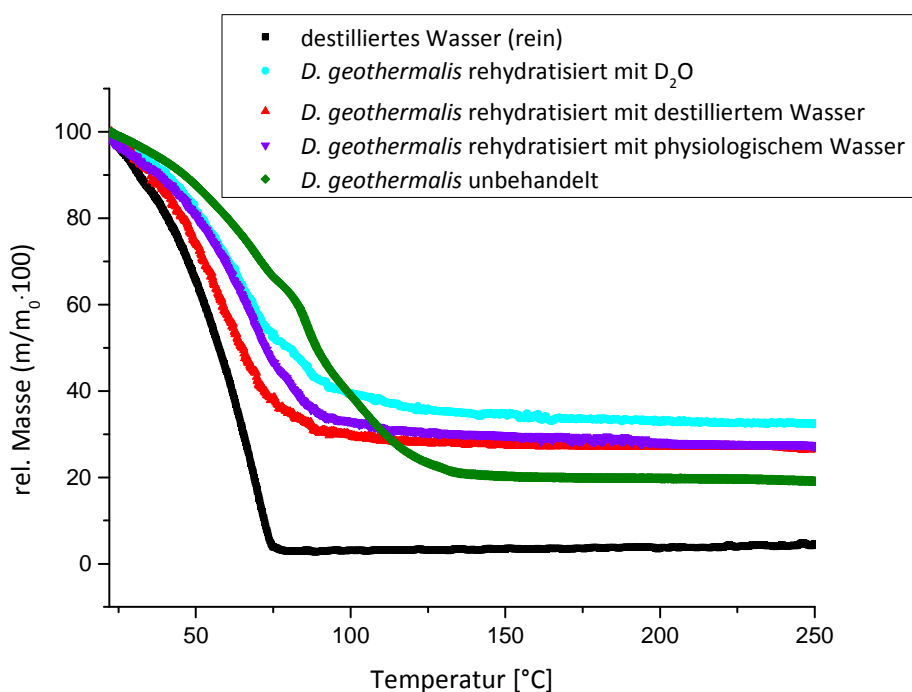


Abbildung 53: Vergleich der Thermogramme von *D. geothermalis* in unbehandelter Form mit den Thermogrammen der rehydratisierten Proben und der Blindprobe bestehend aus destilliertem Wasser.

Wie in Abbildung 53 zu sehen, verdunstet das reine destillierte Wasser ohne Biofilm am schnellsten während der thermogravimetrischen Analyse. Destilliertes

Wasser enthält weder Salze noch Polymere, die zu einer Siedepunktserhöhung führen können. Die zweitschnellste Verdunstungsrate weist der Biofilm auf, der mit destilliertem Wasser rehydratisiert wurde. Dieser Effekt erklärt sich durch die Zugabe von Wasser ohne jegliche Zusätze, wodurch die Polymere und Salze, die in der Biofilm-Matrix vorhanden sind, stark verdünnt werden. Deswegen tritt auch bei ca. 80 °C die Gewichtskonstanz der Probe ein. Die langsamste Verdunstungsrate ist durch die mit deuteriertem Wasser rehydratisierten Probe zu erwarten und auch im Thermogramm in Abbildung 53 zu beobachten. Erst bei Temperaturen von über 100 °C stellt sich bei der mit deuteriertem Wasser rehydratisierten Probe die Gewichtskonstanz ein. Das D₂O besitzt aufgrund des Isotopeneffektes einen um 23% höheren Siedepunkt als H₂O und benötigt daher mehr Energie um den Aggregatzustand der Gasphase zu erreichen. Ein Vergleich der Thermogramme der unbehandelten *D. geothermalis* Probe mit den rehydratisierten Biofilmen in Abbildung 53 zeigt eine schnellere Abgabe des Wassers für die vorher getrockneten und rehydratisierten Bakterienkulturen. Das durch die Rehydratisierung aufgenommene Wasser wird bei erneuter Trocknung schneller abgegeben, als das ursprünglich im Biofilm vorhandene Wasser. Daraus ergibt sich die Konsequenz, dass die Flüssigkeiten, die für die Rehydratisierung verwendet wurden nicht so stark in die Matrix des Biofilms eingebunden wurden. Dieser Effekt könnte zwei Ursachen haben. Zum einen könnte die Rehydratisierungszeit zu kurz gewählt worden sein. Oder das zu viel aufgenommene Wasser (Abbildung 52) verhindert, dass bei einer erneuten Trocknung die Schutzhaut sich genauso schnell ausbildet, als bei einem unbehandelten Biofilm. Da auch bei längeren Rehydratisierungszeiten sich dasselbe Ergebnis der schnelleren Wasserabgabe zeigt (siehe Abbildung 81 in Kapitel 8), muss die erhöhte Wasseraufnahme eine Rolle bei der schnellen Wasserabgabe spielen. Die 5% mehr Wasser im Biofilm bewirken, dass die Schutzhaut sich erst später ausbildet. Es muss mehr Wasser verdunsten, um eine EPS-Konzentration zu generieren die dafür sorgt, dass sich auf der Oberfläche des Biofilms eine Schutzhaut bildet. Somit verdunstet das im Biofilm enthaltene Wasser schneller aus der Matrix, da die sich ausbildende Verdunstungsbarriere, die Schutzhaut, sich erst später ausbildet. Da der Biofilm aus der vorherigen Trockenperiode „gelernt“ hat, hat er bei der Rehydratisierung mehr Wasser in „gebundener“ Form in die EPS-Matrix eingebaut, um bei einer erneuten Trockenperiode ein größeres Reservoir zu besitzen. Dies erklärt,

5. Ergebnisse und Diskussion

warum die rehydratisierten Proben insgesamt ca. 5% weniger Wasser abgeben als die unbehandelte Biofilmprobe.

Die Rehydratisierungsversuche mit dem deuterierten Wasser wurden durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Bakterien das Deuterium in ihren Metabolismus aufnehmen können. Es hätten Stoffwechselstörungen innerhalb der Kolonie auftreten können, die zum Absterben des gesamten Biofilms führen könnten. Das wurde durch CLSM-Messungen (vgl. Kapitel 4.9.) und der Einfärbung mit dem Live/Dead-Kit ausgeschlossen. In Abbildung 54 ist zu sehen, dass auf der rechten Aufnahme, die die mit D₂O rehydratisierten und 2 Wochen gelagerten Bakterien darstellt, wenige rote Stellen zu erkennen sind. Diese roten Bereiche zeigen nur wenige tote oder inaktive Bakterien. Daher ist zu sagen, dass das Deuterium auch nach über 2 Wochen keinen großen Schaden in den Bakterien anrichtet.

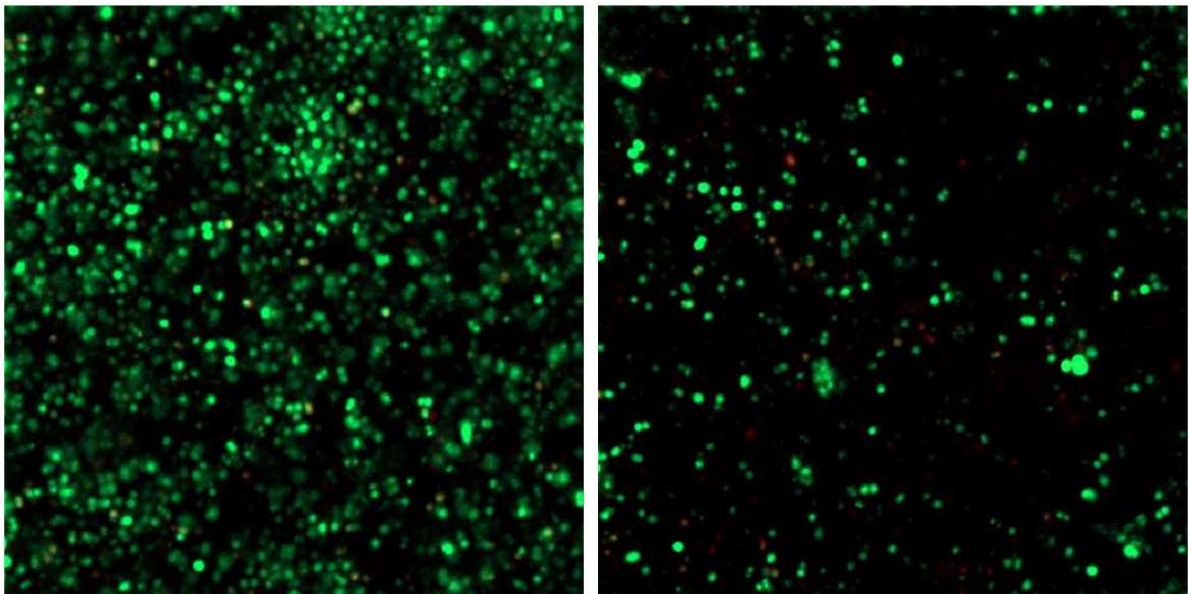


Abbildung 54: Darstellung der CLSM Aufnahmen von *D. geothermalis* unbehandelt (links) und der mit D₂O behandelten Bakterien-Probe (rechts). Die Probe wurde 5 min im Stickstoffstrom (500 mL/min, 30 °C) getrocknet, mit D₂O rehydratisiert und für 2 Wochen auf dem R2A-Agar weiter wachsen lassen. Angefärbt wurde mit Live/Dead.

Um die Existenz der beiden Wasserspezies nicht nur in einem Modellsystem bestehend aus Algenalginat (Kapitel 5.2.1.2.), sondern auch in einer komplexen Matrix, wie einem Biofilm nachzuweisen, wurden ^2H -PFG-NMR-Messungen an dem Biofilm nach Kapitel 4.3. durchgeführt. Dazu wurden Bakterienkolonien dehydratisiert und mit deuteriertem Wasser rehydratisiert. Diese Bakterien, im weiteren Verlauf *D-Bakterien* genannt, wurden auf einem R2A-Agar kultiviert, der mit D_2O angesetzt wurde. In Abbildung 55 ist die Stejskal-Tanner-Auftragung des ^2H -PFG-NMR-Experimentes dargestellt. Die Auswertung des Graphen in Abbildung 55 wurde mit der Exponentialgleichung (Gleichung 54) durchgeführt, die zusammen mit Prof. (em.) Dr. W. Veeman entwickelt wurde.

$$f(x) = \ln(A1 \cdot e^{(-P1 \cdot x)} + A2 \cdot e^{(-P2 \cdot x)}) \quad (54)$$

$P1$ = Selbstdiffusionskoeffizient der schnellen D_2O -Fraktion

$P2$ = Selbstdiffusionskoeffizient der langsamen D_2O -Fraktion

$A1$ = Gewichtungsparmeter der schnellen D_2O -Fraktion

$A2$ = Gewichtungsparmeter der langsamen D_2O -Fraktion

5. Ergebnisse und Diskussion

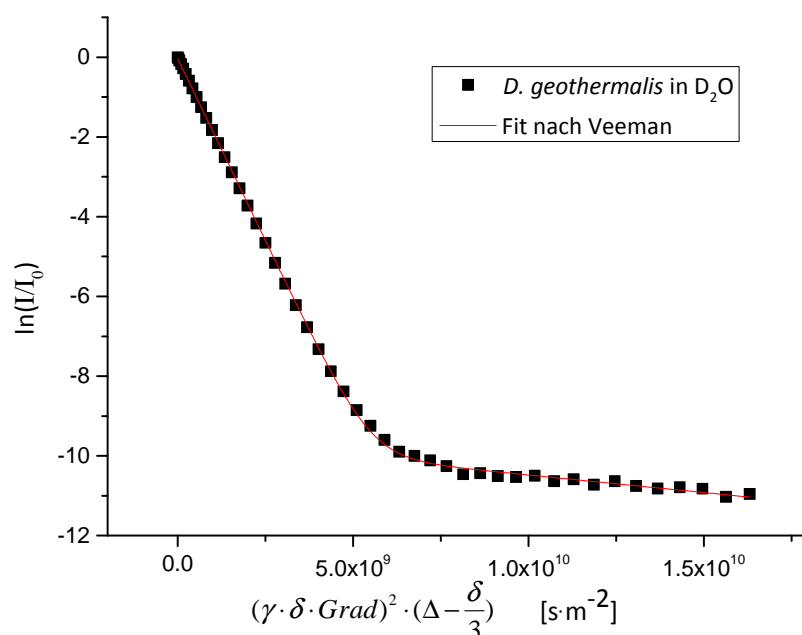


Abbildung 55: Darstellung der Stejskal-Tanner-Auftragung des ^2H -PFG-NMR-Experimentes von *D. geothermalis* in D_2O .

Die VEEMAN-GLEICHUNG (54) beschreibt den Verlauf einer Exponentialfunktion von zwei Komponenten mit unterschiedlich gewichteten Anteilen. In der Abbildung 55 ergibt sich für die schnelle D_2O -Fraktion (1), dem „freien“ Wasser in der Biofilm-Matrix der D-Bakterien, ein Selbstdiffusionskoeffizient von $1.53 \cdot 10^{-9} \frac{\text{m}^2}{\text{s}}$. Die langsame D_2O -Fraktion (2) besitzt einen geringeren Selbstdiffusionskoeffizienten von $1.22 \cdot 10^{-10} \frac{\text{m}^2}{\text{s}}$. Aus diesen Ergebnissen ist abzuleiten, dass auch in einer komplexen Struktur wie einer Biofilm-Matrix eine Unterteilung der gespeicherten Wassersorten in die beiden bekannten Gruppen gemacht werden kann. Der Anteil der „freien“ Wassermoleküle liegt bei über 96% in Bezug auf den gesamten Wassergehalt des Biofilms.

Um die Dynamik der Trocknung von rehydratisierten Biofilm-Proben zu bestimmen wurden Isothermalmessungen mit der dynamischen Differenzkalorimetrie nach Kapitel 4.6. durchgeführt. Die Proben wurden erneut bei 30°C mit einem Volumenstrom von $250 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ in der Trockenkammer vorgetrocknet und bei 30°C in der DSC gemessen. Abbildung 56 zeigt die Messergebnisse dieser Experimente.

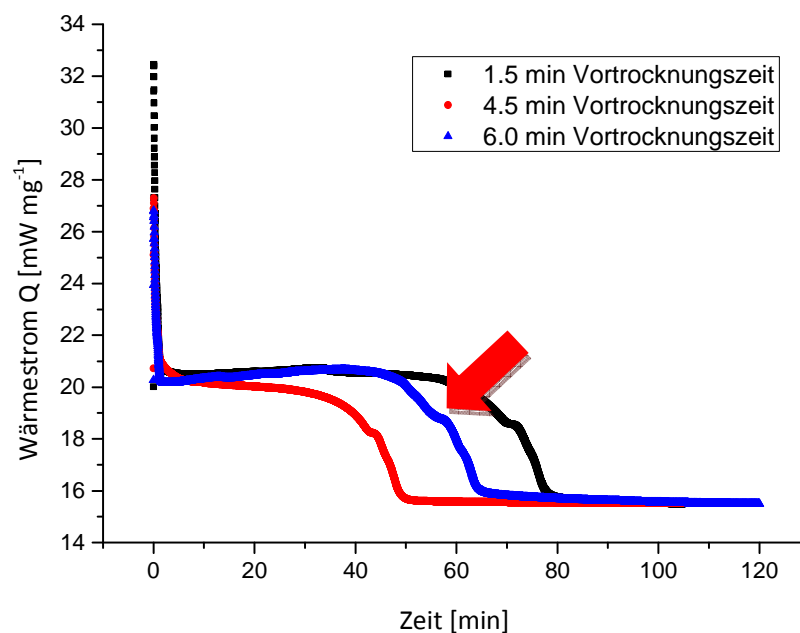


Abbildung 56: Darstellung des Wärmestroms aus der dynamischen Differenzkalorimetrie bei 30 °C von rehydratisierten *D. geothermalis* Proben mit unterschiedlichen Vortrocknungszeiten in der Trockenkammer bei 30 °C und einem Volumenstrom von 250 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

In Abbildung 56 wird der Wärmestrom der rehydratisierten Biofilmp Proben gegen die Messzeit in der dynamischen Differenzkalorimetrie aufgetragen. Der rote Pfeil symbolisiert die dritte Phase aus der Abbildung 45. Nach der Rehydratisierung ist dieses Plateau in den DSC-Messungen deutlich hervorgehoben. Das spricht für einen erhöhten Einbau des Rehydratisierungswassers aus der Trocknungskammer in den Biofilm. Dies kann als ein Hinweis auf eine Art Erinnerungsvermögen des Biofilms gedeutet werden. Durch einen Vergleich von Abbildung 56 mit Abbildung 46 ist zu erkennen, dass bei gleichen Vortrocknungsbedingungen die Trocknung in der DSC deutlich länger dauert. Die Phase des „gebundenen“ Wassers tritt beispielsweise bei einer Vortrocknungszeit von 4.5 min in Abbildung 46 bei ca. 25 min auf. Nach der Rehydratisierung (Abbildung 56) beginnt diese Phase erst bei 60 min (roter Pfeil in Abbildung 57). Das bedeutet, dass die Wasserspeicherung in einem Biofilm kein passiver Prozess ist. Der Biofilm reagiert auf die Trockenperiode und nimmt bei der Rehydratisierung mehr Wasser auf, als er bei der ersten Trocknung abgegeben hat. Diese Dynamik der

5. Ergebnisse und Diskussion

Trocknung und Rehydratisierung ist durch die schematische Darstellung in Abbildung 58 abgebildet.

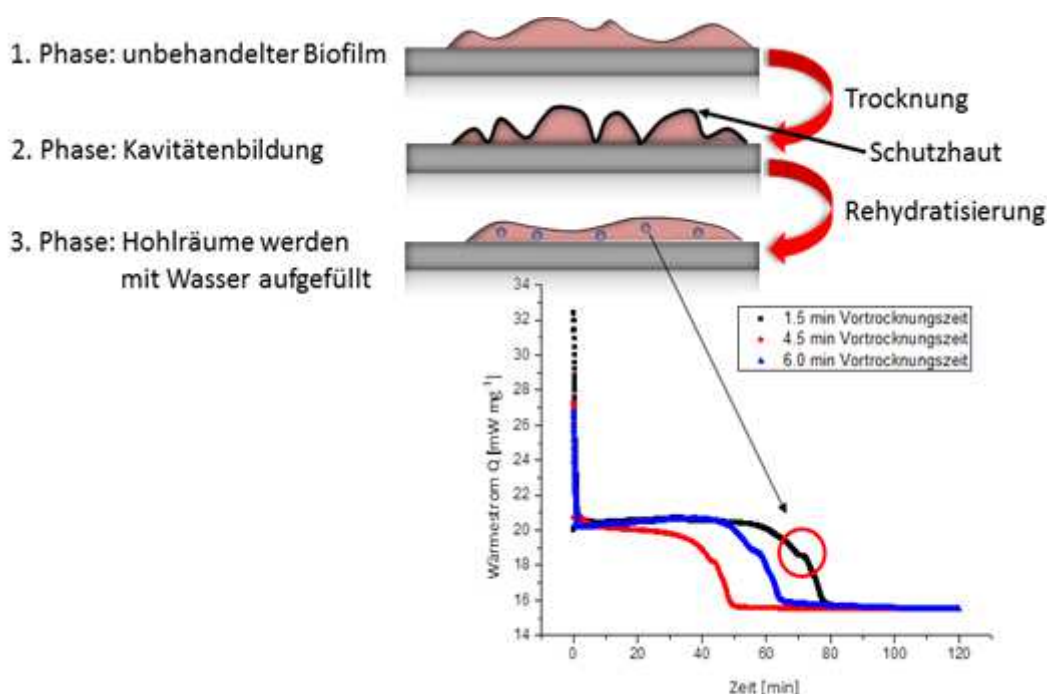


Abbildung 57: Schematische Darstellung der Dynamik der Trocknung und Rehydratisierung eines Biofilms. Die erste Phase stellt einen unbehandelten Biofilm vor der Trocknung dar. Durch die Trocknung bildet sich in der zweiten Phase eine Schutzhaut, die Risse und Hohlräume aufweisen kann, aus. In der dritten Phase wird das durch die Rehydratisierung zur Verfügung stehende Wasser in die Hohlräume eingebunden und tritt in einer erneuten DSC-Isothermalmessung als Plateau auf, welches mit dem roten Kreis gekennzeichnet ist.

Bei den Trocknungsbedingungen bildet sich, wie in Abbildung 57 zu sehen, eine Schutzhaut aus. Wird der Biofilm nach dem Abschluss der Hautbildung weiterhin sehr trockenen Umweltbedingungen ausgesetzt, bilden sich in dieser Schutzhaut Kavitäten (2. Phase). Die Risse werden bei der Rehydratisierung mit dem neu zur Verfügung stehenden Wasser aufgefüllt. Durch diese Risse gelangt mehr Wasser in den Biofilm, als er in der ersten Trocknung abgegeben hat. Daher dauern die DSC-Isothermalmessungen der rehydratisierten Proben (Abbildung 56) deutlich länger als die der unbehandelten (Abbildung 46). In der nächsten Phase (3. Phase in Abbildung 57) werden die Risse wieder verschlossen. Eine Schließung der Hohlräume geschieht durch das Aufquellen des Biofilms durch die Rehydratisierung. Die Risse werden dabei mit EPS-Matrix

überlagert. In den anschließenden DSC-Isothermalmessungen ist dieses neu eingebundene Wasser dann als Plateau (roter Kreis in Abbildung 57) zu erkennen.

Ein Bild der topographischen Gegebenheiten eines getrockneten und wieder rehydratisierten Biofilm erzeugt die Methode der Rasterkraftmikroskopie. In der folgenden Abbildung 58 ist ein unbehandelter Biofilm des Bakteriums *D. geothermalis* dargestellt.

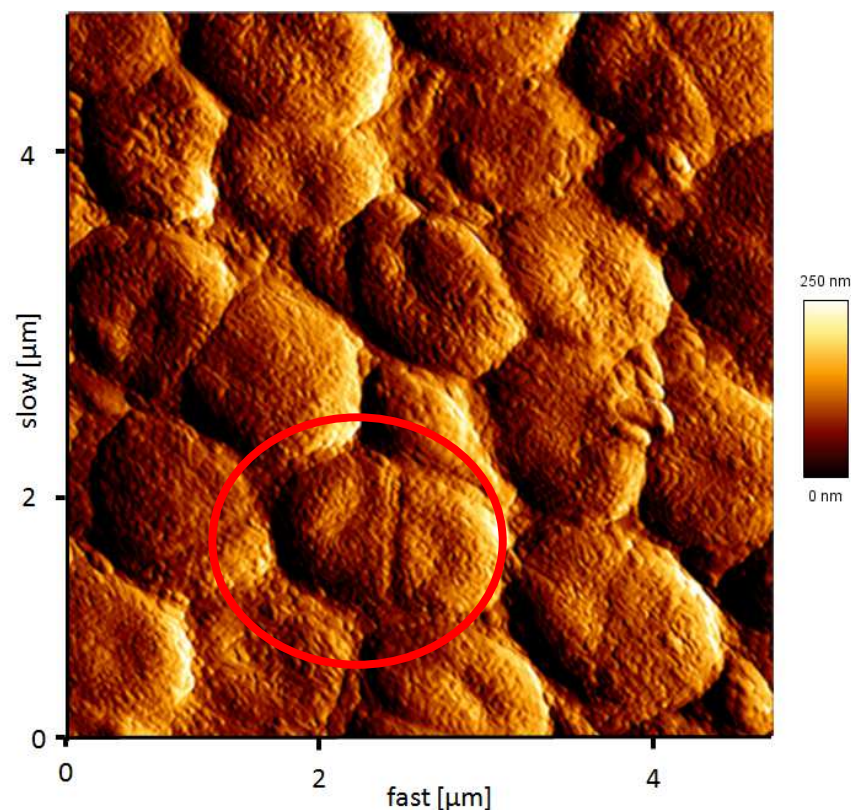


Abbildung 58: Es ist eine AFM-Aufnahme von einem unbehandelten Biofilm des Bakteriums *D. geothermalis* dargestellt. Der rote Kreis kennzeichnet zwei Bakterien die als Diplokokken wachsen.

In der Abbildung 58 wird das Verhalten des Bakteriums *D. geothermalis* in Diplokokken zu wachsen (roter Kreis in Abbildung 58) deutlich. *D. geothermalis* bildet in seiner unbehandelten Form einen sehr voluminösen Biofilm. Zwischen den einzelnen Bakterienzellen bilden sich Zwischenräume, die mit der EPS-Matrix des Bakteriums aufgefüllt sind.

5. Ergebnisse und Diskussion

Bei der Betrachtung einer Biofilm-Probe, die 2 h in der Trocknungskammer bei 30 °C und einem Stickstoffvolumenstrom von 250 mL·min⁻¹ getrocknet wurde (Abbildung 59), sind eindeutige morphologische Unterschiede im Vergleich zu den Bakterien der unbehandelten Probe zu erkennen. Die einzelnen Zellen wirken voluminöser und sind deutlicher als in Abbildung 58 voneinander abgetrennt. Eine Erklärung dafür ist, dass durch die Trockenperiode von 2 h Wasser aus dem Biofilm verdunstet ist.

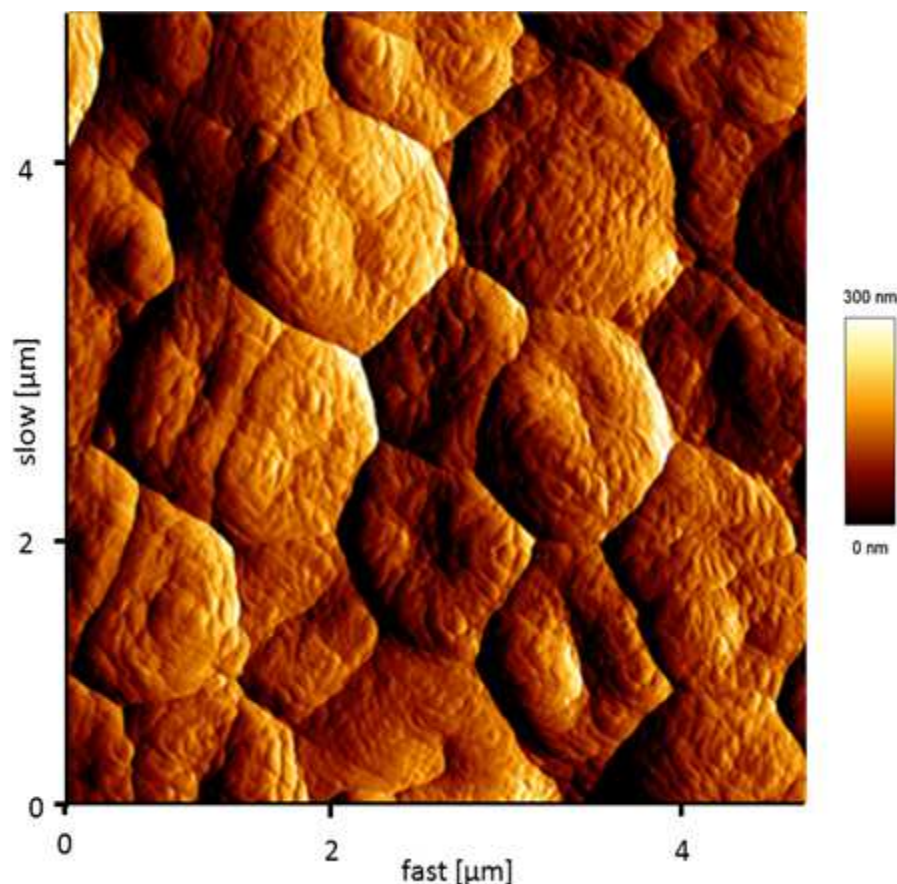


Abbildung 59: Es ist eine AFM-Aufnahme von einem 2 h in der Trocknungskammer bei 30 °C und einem Stickstoffvolumenstrom von 250 mL·min⁻¹ getrocknetem Biofilm des Bakteriums *D. geothermalis* dargestellt.

Der Verlust an Wasser in dem Biofilm sorgt dafür, dass die Gel-Matrix nicht mehr so aufgequollen ist, wie in der unbehandelten Biofilm-Probe in Abbildung 58. Daraus ergibt sich die Konsequenz, dass die einzelnen Bakterienzellen in Abbildung 59 deutlicher zu sehen sind, da sie nicht mehr unter der EPS-Matrix verborgen werden.

In Abbildung 60 ist eine AFM-Aufnahme eines rehydratisierten Biofilms dargestellt. Aufgrund der Rehydratisierung quellen die Bakterien und die gesamte Biofilm-Matrix auf. Alle einzelnen Bakterienzellen wirken noch voluminöser als zuvor, wobei auch die Abgrenzungen zwischen den Kokken wieder zu verschwinden scheinen. Daraus lässt sich erkennen, dass das physiologische Wasser, welches zum Rehydratisieren verwendet wurde, von den Bakterien aufgenommen wurde.

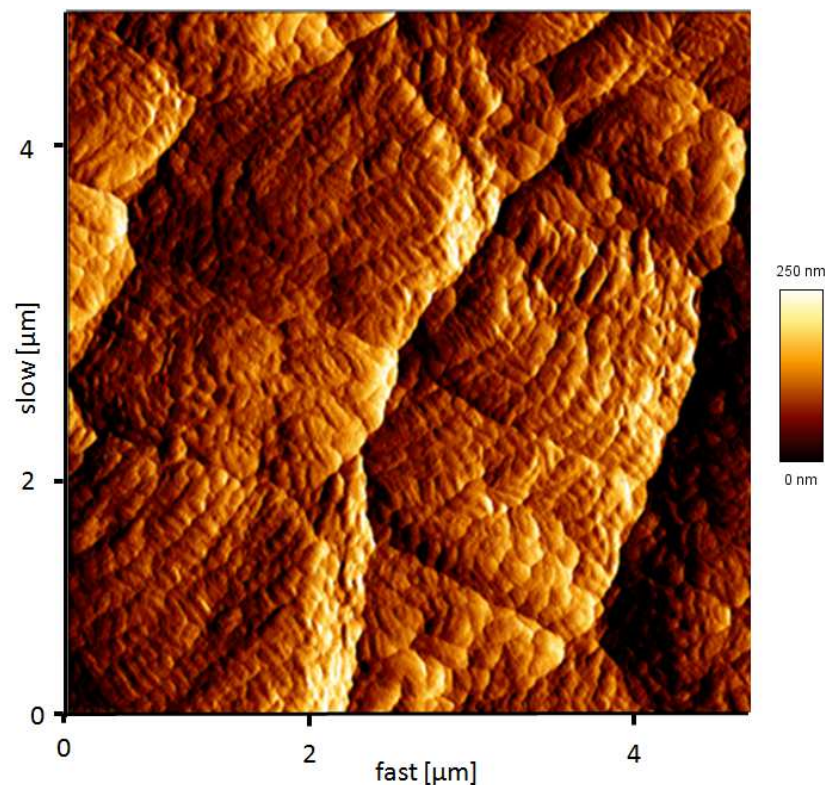


Abbildung 60: Darstellung einer AFM-Aufnahme des Biofilms von *D. geothermalis*, welcher 2 h in der Trocknungskammer bei 30 °C und einem Stickstoffvolumenstrom von 250 mL·min⁻¹ getrocknet und mit physiologischem Wasser 30 min in der Trocknungskammer rehydratisiert wurde.

Eine vollständige Rückkehr zur Morphologie der unbehandelten Bakterienkolonie ist allerdings nicht gelungen. Die bakteriellen Zellen sehen nach der Rehydratisierung aufgequollen aus (Abbildung 60). Die einzelnen Abgrenzungen zwischen den Bakterienzellen sind immer noch zu erkennen. Aus den AFM-Aufnahmen lässt sich schließen, dass der Biofilm im Labormaßstab rehydratisiert werden kann, allerdings nicht alle morphologischen Effekte der Trocknung reversibel sind.

5. Ergebnisse und Diskussion

Zur vollständigen Betrachtung der Trocknungs- und Rehydratisierungsversuche, wurden mit den jeweiligen Biofilmen auch Nanoindentationsversuche (siehe Kapitel 4.10.) durchgeführt. Dabei wurden die Elastizitätskoeffizienten der EPS und der Bakterienzellen bestimmt und in Abbildung 61 gegen die jeweilige Trocknungszeit aufgetragen. Getrocknet wurden die Biofilme wie in Kapitel 4.7. beschrieben in der Trocknungskammer bei 30 °C und einem Stickstoffvolumenstrom von 250 mL·min⁻¹.

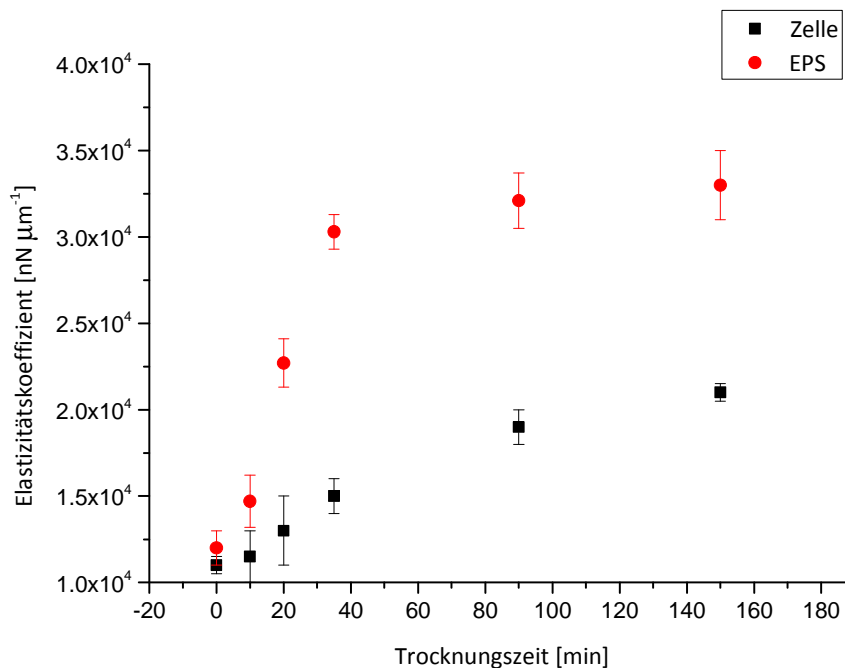


Abbildung 61: Die berechneten Elastizitätskoeffizienten für den Einstich mit der AFM-Spitze direkt in eine Bakterienzelle (schwarz) und in die EPS (rot), erhalten aus den Kraftkurven der verschiedenen Trocknungszeiten.

Der Verlauf der Elastizitätskoeffizienten in Abbildung 61 gibt einen Hinweis über den Ablauf der Schutzhautausbildung. Zu Beginn der Trocknung steigt der Koeffizient bei den Messwerten der EPS- und bakteriellen Zellen exponentiell an. Das Maximum an Festigkeit, mit einem Elastizitätskoeffizienten von 33 N · m⁻¹, stellt sich bei der EPS bereits nach ca. 35 min ein. Daraus lässt sich schließen, dass die Schutzhaut des Biofilms unter diesen Trocknungsbedingungen, wie sie in Kapitel 4.7. beschrieben sind, nach 20 min vollständig ausgebildet ist. Die bakteriellen Zellen erreichen ihre maximale Steifigkeit erst nach ca. 90 min mit einem Elastizitätskoeffizienten von 21 N · m⁻¹. Aus Abbildung 61 ist ersichtlich, dass die Veränderungen der Elastizitätskoeffizienten bei

einem Einstich in die EPS und in die bakteriellen Zellen sich um einen Wert von ungefähr $10 \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$ unterscheiden. Diese Beobachtung, dass die bakteriellen Zellen von *D. geothermalis* erst 55 min nach der EPS ihren maximalen Elastizitätskoeffizienten erreichen, ist ein deutliches Zeichen dafür, dass das „freie“ Wasser bei der Trocknung als erstes aus der EPS-Matrix verdunstet. Danach erst evaporiert das „gebundene“ Wasser aus den Zellen der Biofilm-Matrix.

In der Abbildung 62 sind drei AFM-Aufnahmen der Nanoindentationsversuche dargestellt. Die restlichen AFM-Aufnahmen zu den anderen Trocknungszeiten sind im Kapitel 8 aufgelistet.

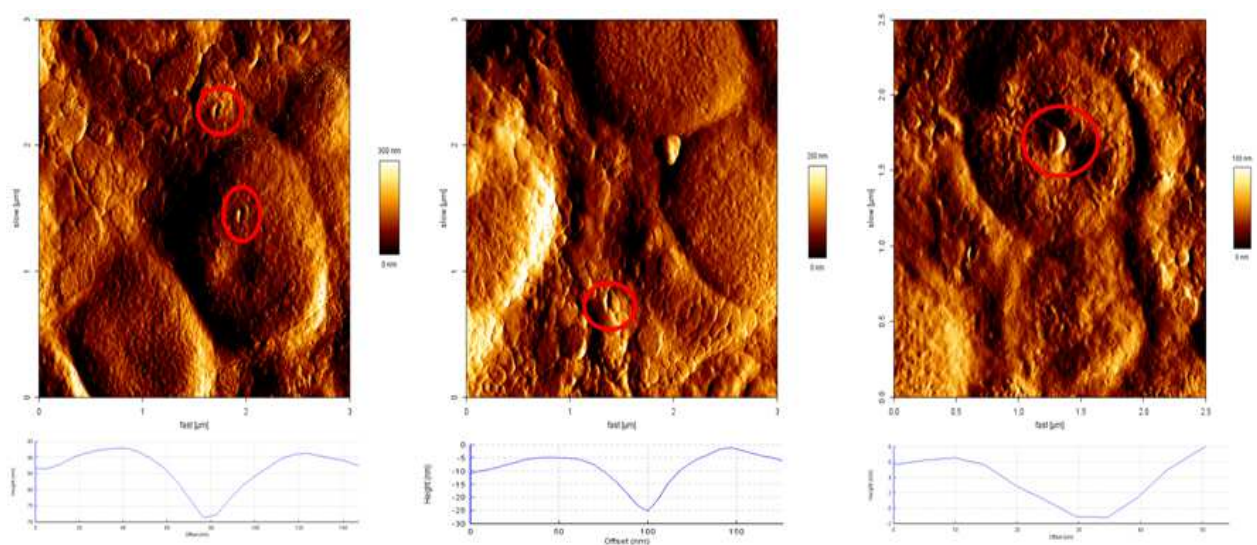


Abbildung 62: Vergleich der AFM-Aufnahmen von *D. geothermalis* unbehandelt (links), 35 min (mittig) und 150 min (rechts) in der Trockenkammer bei 30 °C und einem Stickstoffstrom von $250 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ getrocknet. Die Einstiche durch die AFM-Spitze sind mit einem roten Kreis gekennzeichnet. Die zu dem Einstich gehörigen Höhenprofile befinden sich unter der jeweiligen AFM-Aufnahme.

Bei der Abfolge der AFM-Bilder in Abbildung 62 sind die Trocknungsvorgänge, die mit den Elastizitätskoeffizienten aus Abbildung 61 erklärt wurden, zu beobachten. Die EPS-Matrix beginnt sich zu verhärten und die Zwischenräume zwischen den Bakterien sind von zunehmender Schärfe geprägt (Abbildung 62 mittig und rechts). Die Oberflächenstrukturen werden grobkörniger, wobei sich Kavitäten bilden. Für die rehydratisierten Biofilm-Proben wurden, analog zu den getrockneten Proben Nanoindentationsversuche vorgenommen. Einen Vergleich der Werte des

5. Ergebnisse und Diskussion

Elastizitätskoeffizienten von einer getrockneten und einer rehydratisierten Probe ist in Abbildung 63 bildlich dargestellt.

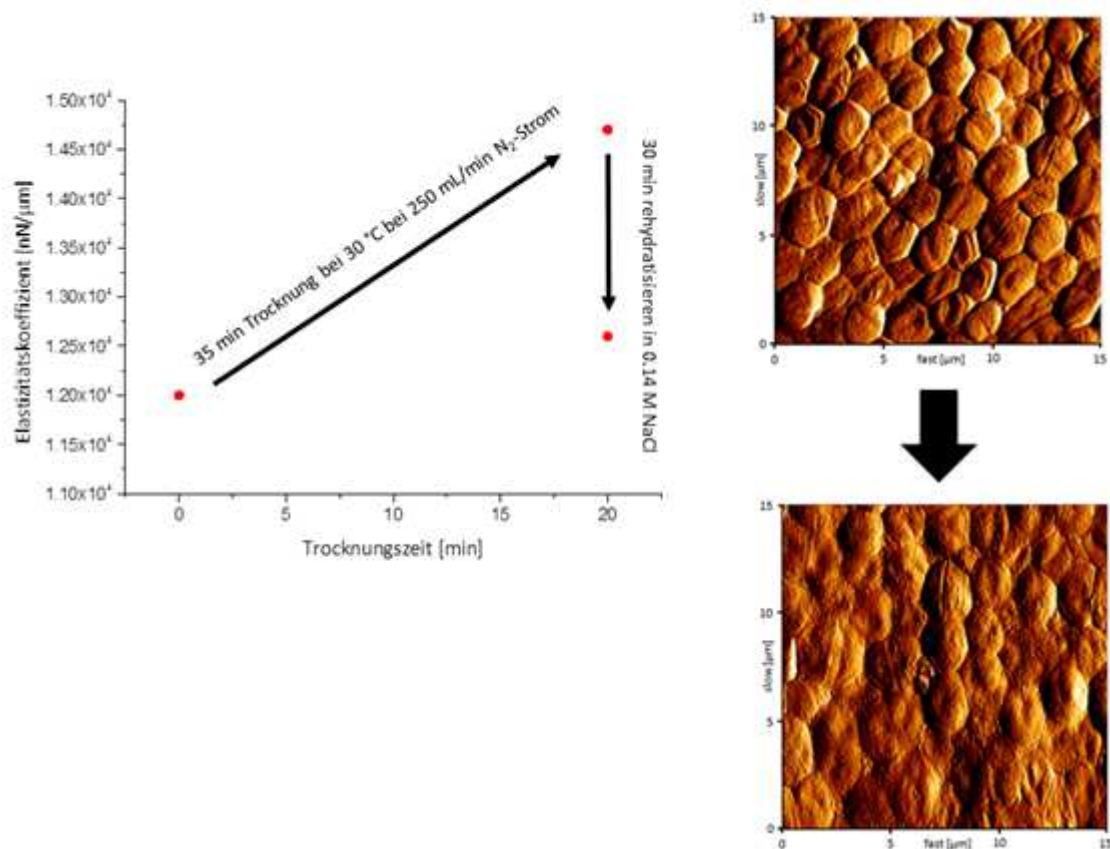


Abbildung 63: Vergleich der Werte des Elastizitätskoeffizienten von einer unbehandelten, einer 35 min bei 30 °C und einem Stickstoffstrom von $250 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ getrockneten und einer 30 min mit physiologischen Wasser rehydratisierten *D. geothermalis*-Probe (links). Darstellung der AFM-Aufnahmen von einer 35 min bei 30 °C und einem Stickstoffstrom von $250 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ getrockneten (rechts, oben) und einer 30 min mit physiologischen Wasser rehydratisierten *D. geothermalis*-Probe (rechts, unten).

Aufgrund der Trocknung werden, durch die Bildung einer Schutzhaut, die Zwischenräume zwischen den einzelnen Bakterienzellen deutlicher herausgestellt (Abbildung 63 oben rechts). Bei der Durchführung einer Rehydratisierung werden diese Zwischenräume wieder mit EPS-Matrix aufgefüllt und die einzelnen Zellen verbergen sich abermals unter den Biopolymeren. Dadurch sind die einzelnen Zellen von *D. geothermalis* nur noch schemenhaft zu erkennen (Abbildung 63, rechts unten). Bei der Betrachtung der Elastizitätskoeffizienten der einzelnen Proben ist ein klarer Verlauf der Ergebnisse zu beobachten. Im Laufe der Trocknung von 35 min ergibt sich für die

trockene Matrix ein Elastizitätskoeffizient von $14.7 \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$. Diese Resultate korrelieren mit den vorherig dargestellten Ergebnissen der Biofilmtrocknung einer bakteriellen Zelle (Abbildung 61). Um sicher zu gehen, dass die Rehydratisierung des Biofilms vollständig abläuft, wurde eine Rehydratisierungszeit von 30 min gewählt. Damit ist, wie aus Abbildung 52 zu entnehmen, bereits das Plateau der Wasseraufnahme erreicht. Bei der Rehydratisierung in Abbildung 63 wurde als Flüssigkeitsquelle physiologisches Wasser mit einer NaCl-Konzentration von $0.14 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ gewählt. Der Wert des Elastizitätskoeffizienten der rehydratisierten Probe liegt unterhalb der des trockenen Biofilms (Abbildung 63 links). Allerdings spiegelt sich auch in diesem Fall das Ergebnis wider, dass die Trocknungseffekte nicht reversibel sind. Der Wert des Elastizitätskoeffizienten der rehydratisierten Probe liegt mit $12.6 \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$ oberhalb des Koeffizienten der unbehandelten Biofilm-Matrix mit $12.0 \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$ (Abbildung 63 links). Dieser Effekt lässt sich dadurch erklären, dass die Schutzhaut noch nicht vollständig mit Wasser benetzt wurde, und sie somit noch einen Teil zur größeren Härte der Biofilmoberfläche beisteuert.

Etwaige Einflüsse der Messanordnung wurden mit weiteren Nanoindentationsversuchen, wie in Kapitel 4.10. beschrieben, überprüft. Dabei sind die Eindringtiefen in eine Biofilm-Matrix, die 150 min in der Trocknungskammer bei 30°C und einem Stickstoffvolumenstrom von $250 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ getrocknet wurde, variiert worden. Es wurde ein getrockneter Biofilm verwendet, damit sich die Werte des Elastizitätskoeffizienten nicht während der Nanoindentationsversuche ändern. In Tabelle 9 sind die Elastizitätskoeffizienten für die Einstiche in die EPS und die bakterielle Zelle mit verschiedenen Eindringtiefen dargestellt

Tabelle 9: Darstellung des Einflusses der Eindringtiefe in den Biofilm von *D. geothermalis* während der Nanoindentationsversuche auf den Elastizitätskoeffizienten bei verschiedenen Eindringtiefen.

Eindringtiefe [μm]	Elastizitätskoeffizient EPS [$\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$]	Elastizitätskoeffizient Zelle [$\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$]
0.2	31.0	21.3
0.4	34.0	25.1
0.6	37.5	26.9

5. Ergebnisse und Diskussion

Aus den Werten der Elastizitätskoeffizienten in Tabelle 9 ist abzulesen, dass sowohl bei den Einstichen in die EPS als auch bei den in die bakterielle Zelle es geringfügig ins Gewicht fällt, ob die AFM-Spitze 0.2 oder sogar 0.4 μm tief in das biologische Material eindringt. Um zu erklären, warum die Werte des Elastizitätskoeffizienten mit steigender Eindringtiefe zunehmen, ist eine erneute Betrachtung des Hertz-Modells und die Modifikation nach Sneddon von Nöten:

$$F = \frac{2}{\pi} \cdot \tan(\alpha) \cdot \frac{E}{(1 - \nu^2)} \cdot \delta^2 \quad (9, \text{ aus Kapitel 3.3})$$

Um den Elastizitätskoeffizienten E der Formel zu bestimmen, muss diese dahingehend umgestellt werden. Dies führt zu folgender Proportionalität.

$$E \propto \frac{F}{\delta^2} \quad (9.1)$$

Durch ein tieferes Eindringen in die zu untersuchende Probe wird der Parameter δ größer. Er erhöht sich dabei sogar um den quadratischen Betrag. Die benötigte Kraft F , um auf die angestrebte Eindringtiefe vorzudringen, erhöht sich folglich ebenfalls. Daraus lässt sich schließen, dass die Werte des Elastizitätskoeffizienten bei steigender Eindringtiefe größer werden. Um reproduzierbare Resultate zu erhalten, sollte die Messanordnung so gewählt werden, dass die Eindringtiefe während der Nanoindentationsversuche nicht verändert wird.

5.3. Einfluss von bakteriellen Endotoxinen auf Zellmembranen

5.3.1. Einfluss von bakteriellen Endotoxinen auf die strukturelle Integrität von humanen Erythrozyten

In dem folgenden Kapitel wird der Einfluss von bakteriellen Endotoxinen auf die Festigkeit von menschlichen Erythrozyten bestimmt. Dazu wurde Humanblut mit einer Lösung aus physiologischer Kochsalzlösung und dem zu untersuchenden Endotoxin, dem Lipopolysaccharid LPS vom Bakterium *E. coli* und dem LPS-RS des Bakteriums *Rhodobacter sphaeroides*, in einer LPS-Konzentration von $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ versetzt (siehe Kapitel 4.10.2.). In einem dritten Experiment wurden beide Lipopolysaccharide gleichzeitig in einem Massenverhältnis von 1 : 1 zu einer Blutprobe hinzugegeben.

Abbildung 64 zeigt drei AFM-Aufnahmen von menschlichen Erythrozyten. Links sind unbehandelte, humane Erythrozyten dargestellt. Sie bilden eine runde scheibenartige Form aus und nur bei sehr genauer Betrachtung ist die Wulst erkennbar, die um die Erythrozyten herumführt. Diese bikonkave Form der roten Blutkörperchen ist nötig, um die Sauerstoffaufnahme zu beschleunigen. [208]

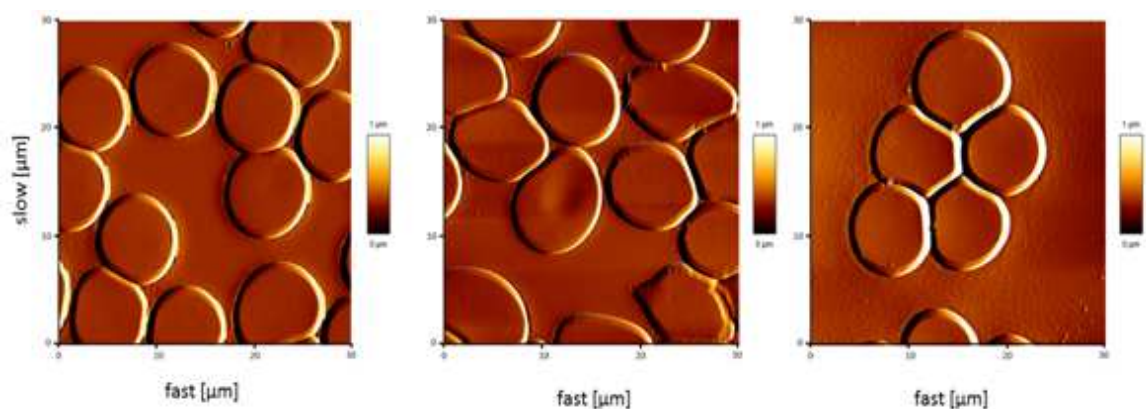


Abbildung 64: Vergleich der AFM-Aufnahmen von menschlichen Erythrozyten unbehandelt (links), mit $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS *E. coli* (mittig) und $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS-RS (rechts) versetzt.

5. Ergebnisse und Diskussion

Bei einem Vergleich der unbehandelten Probe (Abbildung 64 links) mit den Endotoxin-versetzten Erythrozyten (Abbildung 64 mittig und rechts) wird deutlich, dass die mit LPS und LPS-RS versetzten roten Blutkörperchen die runde Form der unbehandelten Blutzellen nicht mehr so stark ausbilden. Diese Erkenntnis könnte einen ersten Hinweis darauf geben, dass die bakteriellen Endotoxine einen Einfluss auf die strukturgebende Zellmembran haben. Allerdings sind die unbehandelten Erythrozyten an Berührungspunkten mit anderen Zellen auch deformiert (Abbildung 64 links). Daher müssen weitere Experimente durchgeführt werden, um exaktere Aussagen über den Einfluss von Endotoxinen auf humane Erythrozyten zu tätigen.

Mit dem Nanoindentationsversuch (siehe Kapitel 4.10.2.) kann der Effekt der Endotoxine auf die Elastizität der Erythrozytenmembran bestimmt werden. Abbildung 65 zeigt die Kraftkurven eines Nanoindentationsversuches für eine unbehandelte Probe, eine mit LPS *E.coli*, eine mit LPS-RS und eine mit LPS + LPS-RS im Massenverhältnis von 1:1 versetzt.

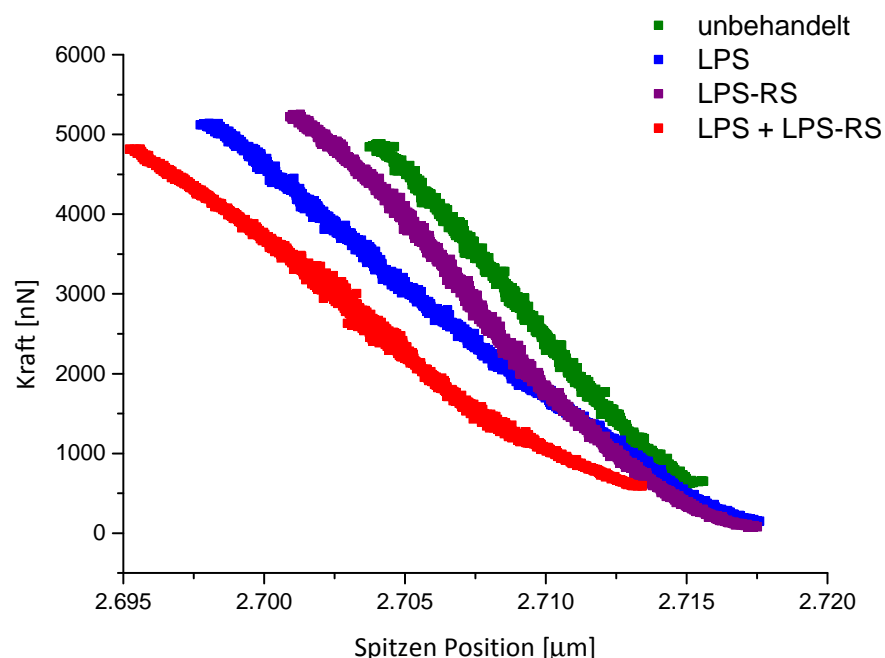


Abbildung 65: Auftragung der Kraft, die benötigt wird um die Spitze des AFM zu bewegen, gegen die Position der AFM-Spitze. Dargestellt sind die Kraftkurven einer unbehandelten (grün), die einer mit LPS (*E. coli*, blau) versetzten, die einer mit LPS-RS (lila) versetzten und die mit beiden Lipopolysacchariden im Massenverhältnis von 1:1 versetzte Erythrozyten-Probe.

In Abbildung 65 ist erkennbar, dass die Kraftkurve bei der unbehandelten Probe die größte Steigung besitzt (grün in Abbildung 65). Durch die Zugabe von bakteriellen Endotoxinen werden die Geraden flacher, was bedeutet, dass die Steigung kleiner wird. Daraus lässt sich ableiten, dass bei dem Eindrückversuch einer unbehandelten Erythrozytenprobe der höchste Widerstand auf die AFM-Spitze gewirkt hat. Wird der Blutprobe das Endotoxin LPS-RS des Bakteriums *R. sphaeroides* zugesetzt, sinkt die Steigung der Geraden (Abbildung 65). Durch eine Zugabe des Lipopolysaccharids LPS des Bakteriums *E. coli* zu einer unbehandelten Blutprobe verringert sich der Quotient aus Kraft und Weg noch stärker als bei dem LPS-RS zuvor. Die größte Abnahme des Kraft-Weg-Quotienten wird durch die Addition beider Endotoxine im Massenverhältnis von 1:1 erzielt. Aus den Kraftkurven aus Abbildung 65 lassen sich die Elastizitätskoeffizienten der jeweiligen Erythrozyten bestimmen (Tabelle 10).

Tabelle 10: Auflistung der Werte des Elastizitätskoeffizienten der Erythrozyten mit verschiedenen Endotoxinen versetzt.

Probe	Elastizitätskoeffizient [$\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$]
unbehandelte Erythrozyten	440 ± 20
Erythrozyten + LPS	310 ± 40
Erythrozyten + LPS-RS	350 ± 35
Erythrozyten + LPS + LPS-RS	240 ± 50

Bei der Betrachtung der Werte des Elastizitätskoeffizienten in Tabelle 10 lässt sich ein klarer Trend erkennen. Durch die Zugabe von bakteriellen Endotoxinen sinken die Werte des Elastizitätskoeffizienten. Der Elastizitätskoeffizient der Erythrozyten sinkt durch die Zugabe von LPS *E. coli* um 30%, im Vergleich zu einer unbehandelten Probe (Tabelle 10). Dieses Ergebnis bedeutet, wenn sich diese Endotoxinmoleküle im menschlichen Blut befinden würden, ist eine Einlagerung in die Zellmembran der roten Blutkörperchen möglich. Aufgrund deren Geschwindigkeit von durchschnittlich $1 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ in der menschlichen Blutbahn und den Stößen der Erythrozyten mit der Gefäßwand und anderen Blutzellen [209] kann es dazu kommen, dass die Membran durch den LPS-Einbau so stark geschwächt wird, dass sie kollabiert. Wenn die roten Blutkörperchen anfangen, sich aufzulösen, wird in der Medizin von einer Hämolyse gesprochen. [210]

5. Ergebnisse und Diskussion

Aufgrund der Abnahme der Steifigkeit der roten Blutkörperchen muss davon ausgegangen werden, dass der Einbau der Endotoxine LPS und LPS-RS in die Membran der roten Blutkörperchen eine Schwächung der strukturellen Integrität der Membran hervorruft. Allerdings wirkt nicht nur das LPS *E. coli* auf die Struktur der Erythrozyten. Auch das als „ungiftig“ eingestufte LPS-RS [211] hat einen Effekt auf die Membran. Wie aus Tabelle 10 abzulesen, sinkt der Elastizitätskoeffizient der roten Blutzellen durch Zugabe von LPS-RS um 20% auf einen Wert von $350 \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$. In vorherigen Studien wurde das LPS-RS als Antagonist für das LPS bei der TLR-4 Rezeptorenbesetzung eingesetzt, da es diese reversibel besetzt. [211,212] Jedoch wird durch die Anhaftung an TLR-4 keine Reaktionskaskade ausgelöst. Die Resultate der Nanoindentationsversuche in Tabelle 10 und Abbildung 65 liefern erste Hinweise darauf, dass das Lipopolysaccharid LPS-RS des Bakteriums *R. sphaeroides* nicht vollständig harmlos für den menschlichen Körper sein kann. Auch durch dieses Lipopolysaccharid wird die Struktur der roten Blutzellen geschwächt. Sollte sich das LPS-RS auch bei der Membranintegration als Antagonist, sowie bei der TLR-4 Besetzung, zum LPS *E. coli* verhalten, müsste sich der negative Effekt des LPS beim Einbau in die Membran aufheben, wenn beide Moleküle gleichzeitig zu einer Blutprobe hinzugegeben werden. Wie allerdings in Abbildung 65 und Tabelle 10 zu erkennen ist, ist dies nicht der Fall. Ganz im Gegenteil, durch eine Kombination beider Lipopolysaccharide zu einer unbehandelten Blutprobe im Massenverhältnis von 1 : 1 ergibt sich eine Absenkung des Elastizitätskoeffizienten von 45% gegenüber einer nicht mit Endotoxinen behandelten Probe.

Aus den AFM-Ergebnissen wird gefolgert, dass durch den Einbau beider Endotoxine sich die strukturelle Festigkeit um fast die Hälfte verringert hat. Damit kann bewiesen werden, dass das beide Lipopolysaccharide einen starken negativen Einfluss auf die strukturellen Eigenschaften der roten Blutkörperchen besitzen.¹

¹ Die Messungen und Ergebnisse der menschlichen Erythrozyten sind in einer Kooperation mit dem Institut für Physiologische Chemie der Universität Duisburg-Essen entstanden.

5.3.2. Einfluss von bakteriellen Endotoxinen auf die strukturelle Integrität von DMPC-multilamellaren Vesikeln

Im vorherigen Kapitel 5.3.1. wurde ein Effekt des Lipopolysaccharids (LPS) auf die strukturelle Integrität von Erythrozyten festgestellt. Um den Effekt genauer zu untersuchen wurden Experimente in einem vereinfachten Zellmembransystem durchgeführt. Dazu wurden künstlichen Zellmembranen in Form von multilamellaren Vesikeln (MLV) synthetisiert (siehe Kapitel 4.11.). Um die Vesikel darzustellen wurde das 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DMPC) verwendet. Dieses Molekül gehört zu der Stoffklasse der Phospholipide, welche den Hauptbestandteil von Zellmembranen ausmacht.

Der Nachweis, dass die LPS-Moleküle sich in die Membran der Vesikel integrieren, wurde mit der Methode der ^1H -PFG-NMR nach Kapitel 4.13. durchgeführt. Mit der Auswertung von PFG-NMR-Experimenten, in Form der Stejskal-Tanner-Auftragungen, ist es möglich, die Selbstdiffusionskoeffizienten der in der Lösung enthaltenen Fraktionen zu bestimmen. Die ermittelten negativen Steigungen aus einer Stejskal-Tanner-Auftragung sind gleichbedeutend mit den Selbstdiffusionskoeffizienten der Komponenten in der zu untersuchenden Lösung. Wie in Kapitel 4.13. beschrieben, sind für den Nachweis der Integration der LPS-Moleküle in die künstliche Zellmembran zwei unterschiedliche ^1H -PFG-NMR-Experimente durchgeführt worden. Einerseits wurde das Lipopolysaccharid LPS in D_2O alleine gemessen. Andererseits wurde zu dieser LPS-Probe die synthetisierten DMPC-MLV zugesetzt, in D_2O gelöst und mit der PFG-NMR gemessen. In den ^1H -PFG-NMR-Messungen wurden die aliphatischen NMR-Signale (0.7 – 1.5 ppm, Abbildung 66) des LPS-Moleküls, aus dem Lipid-A-Bereich (siehe Abbildung 11), für die Auswertung der ^1H -PFG-NMR-Experimente analysiert.

5. Ergebnisse und Diskussion

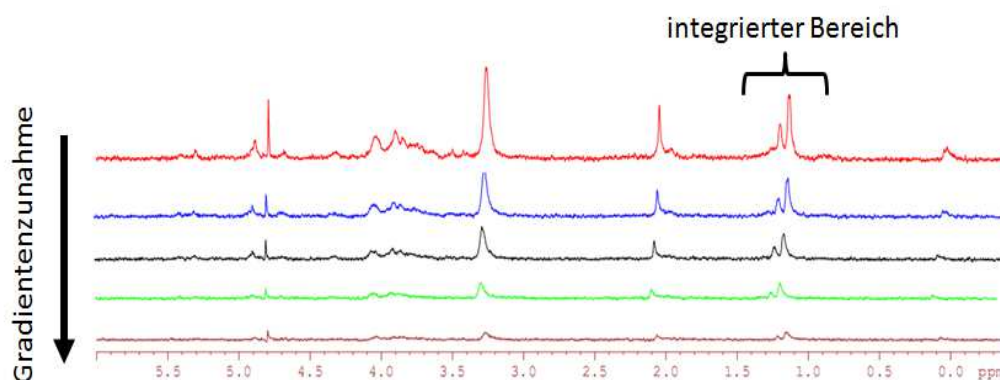


Abbildung 66: Darstellung des ^1H -PFG-NMR-Spektrums des LPS bei Erhöhung der Gradientenstärke G . Der Gradient nimmt von oben nach unten hin zu. Eingezeichnet ist der für die Auswertung der Stejskal-Tanner-Auftragungen verwendete (integrierte) Bereich.

Sämtliche aliphatischen Gruppen sind in dem DMPC- d_{54} vollständig deuteriert [213] und erzeugen keine störenden Signale für das Experiment von LPS mit den DMPC- d_{54} Vesikeln. Die aus diesen Experimenten resultierenden Stejskal-Tanner-Auftragungen sind in Abbildung 67 dargestellt.

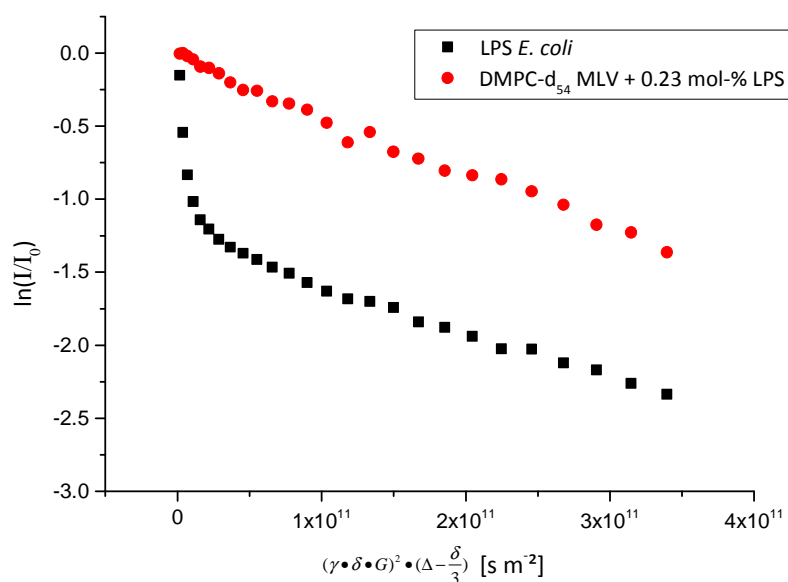


Abbildung 67: Auftragung nach Stejskal-Tanner aus den ^1H -PFG-NMR Messungen von LPS *E. coli* (schwarz) und DMPC- d_{54} -Vesikel mit 0.23 mol-% LPS (rot) in D_2O . Die Zahlen (1) und (2) symbolisieren die zwei unterschiedlichen Steigungen und damit verschiedene Selbstdiffusionskoeffizienten in der LPS-Probe.

In Abbildung 67 sind für die Messung des reinen LPS *E. coli* zwei unterschiedliche Steigungen im Kurvenverlauf festzustellen. Das bedeutet, dass in der Lösung des reinen LPS zwei unterschiedliche Selbstdiffusionskoeffizienten bestimmt werden können. Wird der Lösung aus LPS *E. coli* multilamellare Vesikel, die künstliche Zellmembranen darstellen, bestehend aus deuteriertem DMPC-d₅₄ hinzugefügt, verändert sich die Stejskal-Tanner-Auftragung dahingehend, dass nur noch eine Gerade erkennbar ist (Abbildung 67). Das bedeutet, dass alle LPS-Moleküle, in dem PFG-Experiment mit den DMPC-MLV, denselben Selbstdiffusionskoeffizienten besitzen. Die Steigung und damit auch der Selbstdiffusionskoeffizient der LPS-Fraktion in diesem PFG-Experiment ist, wie in Tabelle 11 aufgeführt, um 22% größer als die der langsamen LPS-Fraktion der reinen LPS Probe.

Tabelle 11: Aufstellung der Selbstdiffusionskoeffizienten der schnellen und langsamen LPS-Fraktion aus den Stejskal-Tanner Auftragungen (Abbildung 69) der ¹H-PFG-NMR Messungen von reinem LPS und LPS mit DMPC-d₅₄.

	Selbstdiffusionskoeffizient [m ² s ⁻¹]	
	schnelle LPS-Fraktion	langsame LPS-Fraktion
LPS rein	$3.58 \cdot 10^{-11}$	$2.60 \cdot 10^{-12}$
DMPC-d ₅₄ + 0.23 mol-% LPS	-	$3.33 \cdot 10^{-12}$

Aus der Tatsache, dass in der Lösung des reinen LPS zwei verschiedene Selbstdiffusionskoeffizienten detektiert werden können (Tabelle 11), lässt sich schließen, dass sich in der Lösung von reinem LPS zwei, sich in Struktur und Größe unterscheidende molekulare Anordnungen der LPS-Moleküle befinden. Der erste Abschnitt (1 in Abbildung 67) beschreibt eine schnelle LPS-Fraktion mit einem großen Selbstdiffusionskoeffizienten. Der sich anschließende zweite Bereich (2 in Abbildung 67) ist durch eine langsame LPS-Fraktion mit kleinerem Selbstdiffusionskoeffizienten gekennzeichnet. Durch die DMPC-MLV-Zugabe zu der reinen LPS-Lösung kann nur noch ein Selbstdiffusionskoeffizient ermittelt werden.

5. Ergebnisse und Diskussion

Aus den Selbstdiffusionskoeffizienten in Tabelle 11 kann mittels Verdopplung von Gleichung 41 (Kapitel 3.6.) der hydrodynamische Durchmesser der einzelnen Komponenten bestimmt werden. Daraus ergibt sich für die schnelle LPS-Fraktion (1) des reinen LPS ein Durchmesser von 11.6 nm. Eine der möglichen Erklärungen des Selbstdiffusionskoeffizienten der schnellen LPS-Fraktion ist die Ausbildung von Mizellen, die aus den amphiphilen LPS-Molekülen bestehen. Um Mizellen zu bilden, muss die kritische Mizellenbildungskonzentration (CMC) überschritten oder nahezu erreicht sein. Für die meisten amphiphilen Phospholipide, die die Eigenschaft besitzen, selbständig Membranen zu bilden, liegt diese CMC bei $c \leq 1 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. [214] In den ^1H -PFG-NMR-Experimenten aus Abbildung 67 ist die Konzentration von LPS so gewählt, dass sie der Konzentration von 0.23 mol-%, in Bezug zur DMPC-Konzentration, in den nachfolgenden Messungen entspricht. Daraus ergibt sich eine Konzentration des eingesetzten LPS von $8.5 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, die somit oberhalb der kritischen Mizellenbildungskonzentration liegt.

Die zweite Steigung der PFG-NMR-Messung (2 in Abbildung 67) ist deutlich flacher als die erste Steigung des reinen LPS. Aufgrund des Selbstdiffusionskoeffizienten in Tabelle 11 wird diese LPS-Fraktion durch eine Struktur bestimmt, die einen hydrodynamischen Durchmesser von 160 nm besitzt. Es muss sich spontan eine übergeordnete Struktur gebildet haben. Dabei könnte es sich um Agglomerate des LPS handeln. [215] Mit dem Selbstdiffusionskoeffizient von $3.33 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Tabelle 11) lässt sich der hydrodynamische Durchmesser der Vesikel berechnen. Der hydrodynamische Durchmesser der mit LPS versetzten multilamellaren Vesikel beträgt 130 nm. Die Schlussfolgerung aus den Resultaten der ^1H -PFG-NMR-Experimente (Abbildung 67) ist, dass die frei gelösten LPS-Moleküle nicht gleichzeitig neben einer DMPC-Membran existieren können. Es herrscht eine Art Affinität zwischen LPS und Zellmembranen bestehend aus dem Phospholipid DMPC. Allerdings kann durch diese Ergebnisse nicht vollständig bewiesen werden, dass die LPS-Moleküle sich auch in den Membranen der Vesikel eingebaut haben. Sie könnten sich theoretisch auch auf der Vesikeloberfläche angebunden haben.

In den folgenden AFM- und Particle Tracking-Experimenten wird nachgewiesen, dass sich die LPS-Moleküle in die Membran integriert haben und nicht nur auf der Oberfläche der Vesikel angelagert sind. Dafür muss eine Aussage über Veränderungen der Form, der Größe und der Elastizität der DMPC-MLV bei der Zugabe von LPS gemacht werden.

Es wurde, wie in Kapitel 4.14. beschrieben, drei verschiedenen LPS-Konzentrationen zu den Vesikeln hinzugegeben, und mittels AFM analysiert. In der Abbildung 68 werden unbehandelte DMPC-MLV dargestellt. Diese Abbildung dient für die folgenden Erkenntnisse als Blindproben, um die Resultate und den Einfluss des Endotoxins LPS *E. coli* auf die Membran korrekt zu interpretieren.

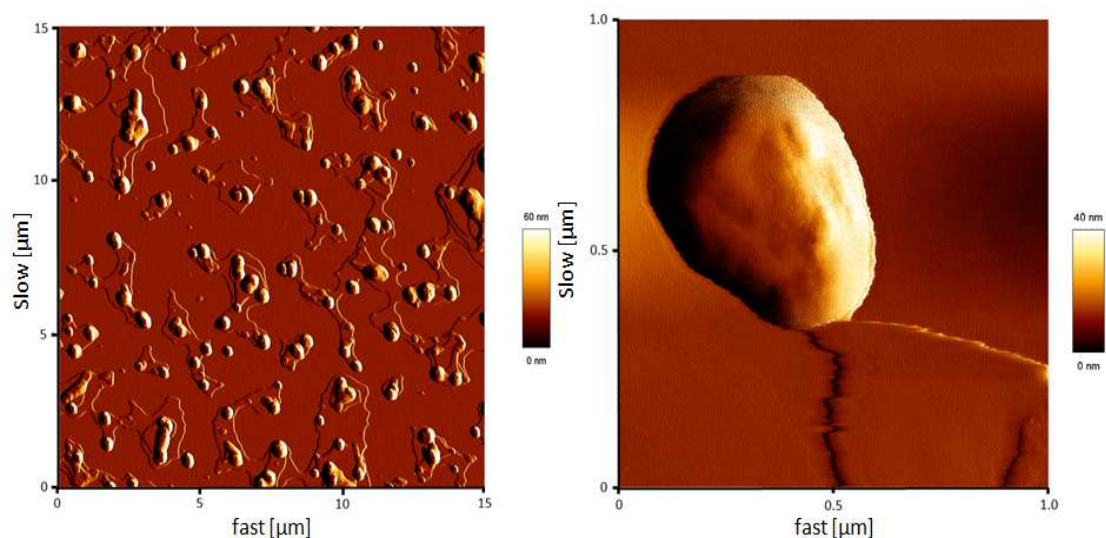


Abbildung 68: Darstellung von zwei AFM-Aufnahmen einer DMPC-MLV-Probe. Auf der linken Seite ist die unbehandelte Probe in einem größeren Maßstab dargestellt. Die rechte Seite zeigt ein einzelnes Vesikel.

Die AFM-Aufnahmen der unbehandelten DMPC-MLV-Probe zeigen eine sphärische Form der Phospholipidvesikel (Abbildung 68). Von außen betrachtet, ist es nicht möglich, Auskunft darüber zu geben, ob es sich bei den vorliegenden Vesikeln um MLV oder ULV (unilamellare Vesikel) handelt. Um die Existenz mehrerer Schichten innerhalb eines Vesikels zu beweisen, ist ein Nanoindentationsversuch an den Vesikeln durchgeführt worden. In der folgenden Auftragung (Abbildung 69) ist die Kraftkurve

5. Ergebnisse und Diskussion

eines Nanoindentationsversuches aufgezeigt. Dabei ist die benötigte Kraft, um den eingestellten Weg zurückzulegen, gegen die Position der AFM-Spitze aufgetragen.

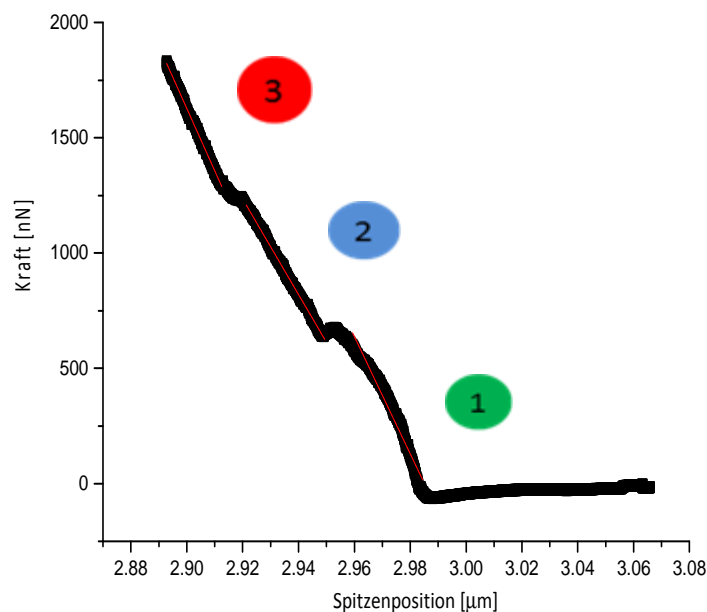


Abbildung 69: Auftragung der benötigten Kraft der AFM-Spitze gegen die Position der Spitze bei einem Nanoindentationsversuch von einem multilamellaren Vesikel bestehend aus DMPC. Die Zahlen (1)-(3) kennzeichnen die unterschiedlichen Membranschichten.

Die Plateaus in Abbildung 69 weisen darauf hin, dass an diesem Punkt eine der Membranen des multilamellaren Vesikels durchstoßen wurde. Das würde bei der AFM-Messung in Abbildung 68 bedeuten, dass das Vesikel aus drei Doppelschichten besteht. Bei der Betrachtung der Elastizitätskoeffizienten (Tabelle 12) der einzelnen Membranen (in Abbildung 69 mit 1-3 gekennzeichnet) fällt auf, dass die benötigte Kraft, um die jeweilige Membran zu durchstoßen, von außen nach innen hin zunimmt. Dabei repräsentiert die 1 in Abbildung 69 die äußere und die 3 die innere Membran des Vesikels.

Tabelle 12: Aufstellung der Elastizitätskoeffizienten der Membranschichten der Nanoindentationsversuche an einem multilamellaren Vesikel (Abbildung 71).

	Elastizitätskoeffizient [$\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$]
1. Membran (1 in Abbildung 71)	22.5
2. Membran (2 in Abbildung 71)	25.4
3. Membran (3 in Abbildung 71)	27.0

Der steigende Wert des Elastizitätskoeffizienten lässt sich durch den Krümmungsradius, wie in Kapitel 3.3. beschrieben, erklären. Je kleiner das Vesikel innerhalb des MLV wird, desto größer ist die mechanische Stabilität des Partikels. Daher ist eine höhere Kraft von Nöten, um die Membran zu durchstoßen.

Um den Einfluss der LPS-Moleküle auf die Größe der Vesikel zu untersuchen, wurde der hydrodynamische Durchmesser d_H der multilamellaren Vesikel mit der Methode des Particle Tracking mit einem Dunkelfeldmikroskop bestimmt (siehe Kapitel 4.12.). Die Größenverteilungen sind in Abbildung 70 zusammengefasst dargestellt.

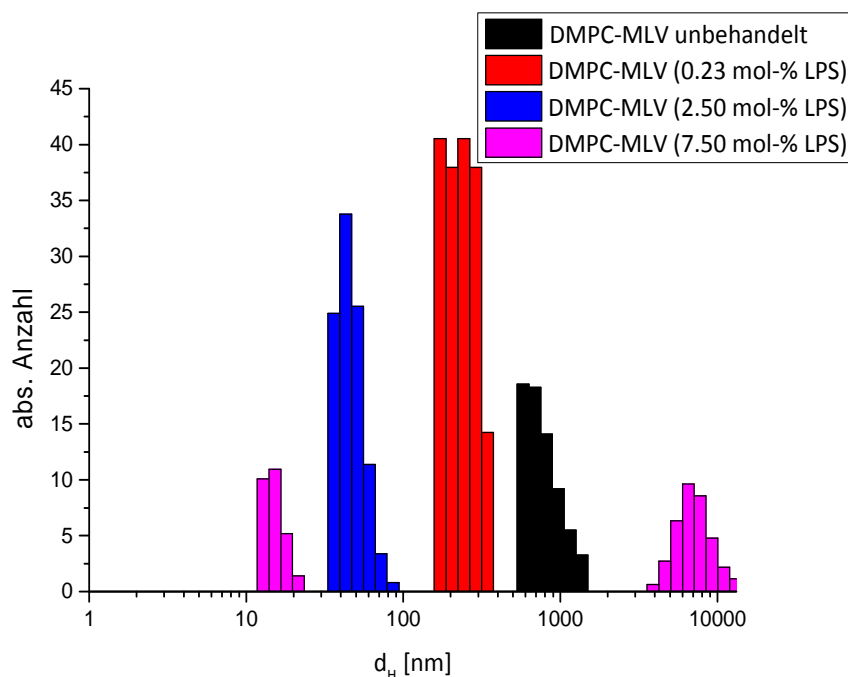


Abbildung 70: Darstellung der Größenverteilungen der multilamellaren DMPC-Vesikel gemessen mit dem Dunkelfeldmikroskop. Die Vesikel wurden unbehandelt (schwarz) mit 0.23 mol-% LPS versetzt (rot), mit 2.5 mol-% LPS versetzt (blau) und mit 7.5 mol-% LPS versetzt (lila) im Dunkelfeld gemessen.

5. Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 70 sind die absoluten Anzahlen der DMPC-MLV gegen den hydrodynamischen Durchmesser aufgetragen. Dabei ist zu erkennen, dass je größer die LPS Konzentration in der Lösung ist, desto kleiner sind die hydrodynamischen Durchmesser der DMPC-MLV. Die unbehandelten DMPC-Vesikel besitzen einen hydrodynamischen Durchmesser von mehreren hundert bis zu tausend Nanometer. Durch die Zugabe von LPS schrumpft dieser Wert kontinuierlich bis auf wenigen Nanometer. Dieser Effekt beruht darauf, dass das eingesetzte Endotoxin LPS *E. coli* in der Lösung als „Cotensid“ synergistisch mit dem DMPC wirkt und damit kleinere Krümmungsradien bei den Vesikeln erzeugt werden können. Des Weiteren ist in der Graphik klar zu erkennen, dass sich bei einer LPS-Konzentration von 7.5 mol-% zwei Fraktionen ausbilden. Der Bereich unterhalb von 10 nm wird durch die kleinen multilamellaren Vesikel repräsentiert. Sämtliche Partikel im Bereich oberhalb von 1000 nm stellen, wie im weiteren Verlauf erklärt, Agglomerate an DMPC dar, die sich während der Beschallung aus den Bruchstücken der MLV gebildet haben.

Die in Abbildung 70 nachgewiesene Größenveränderung der multilamellaren Vesikel, aufgrund der LPS-Zugabe, wird durch AFM-Aufnahmen an den mit Endotoxin versetzten Vesikeln bestätigt. Die Zugabe von 0.23 mol-% LPS *E. coli* zu den DMPC-MLV verursacht eine Größenveränderungen (Abbildung 70) und eine Formveränderungen der DMPC-Vesikel (Abbildung 71). Die Vesikel weisen keine sphärische Form auf, wie sie die Vesikel der unbehandelten Probe in Abbildung 68 besitzen. Diese Veränderung der äußeren Form wurde zuvor bereits bei den Versuchen mit den humanen Erythrozyten (Kapitel 5.3.1.) festgestellt.

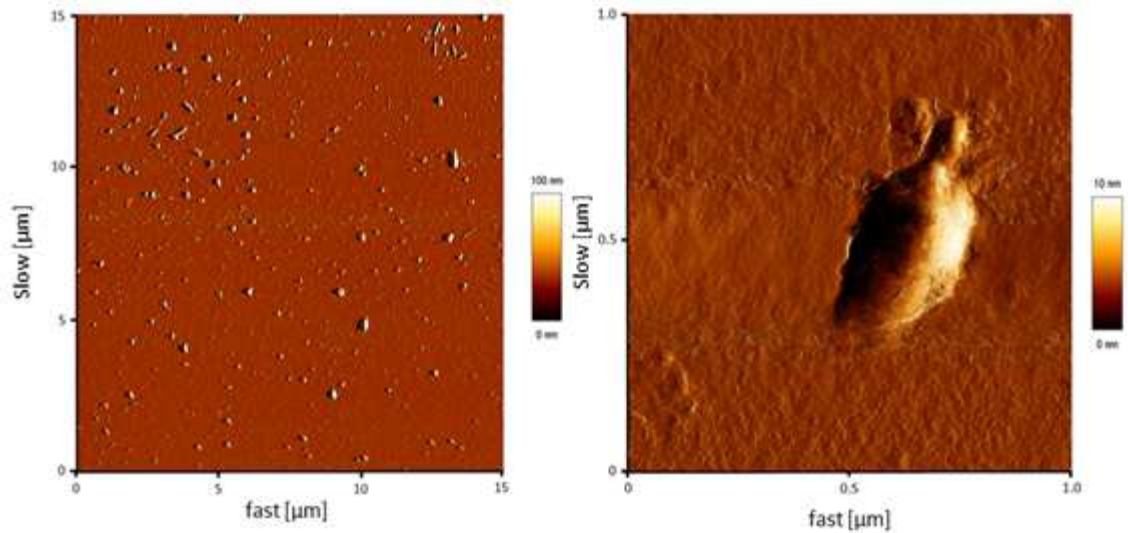


Abbildung 71: Darstellung von zwei AFM-Aufnahmen einer mit 0.23 mol-% LPS *E. coli* versetzten DMPC-MLV-Probe. Auf der linken Seite ist die unbehandelte Probe in einem größeren Maßstab dargestellt. Die rechte Seite zeigt ein einzelnes Vesikel.

Noch deutlicher wird der Effekt des LPS auf Form und Größe der Vesikel bei einer LPS-Konzentration von 2.5 mol-% (Abbildung 72). Der hydrodynamische Durchmesser der multilamellaren Vesikel sinkt deutlich gegenüber der unbehandelten Probe (Abbildung 70).

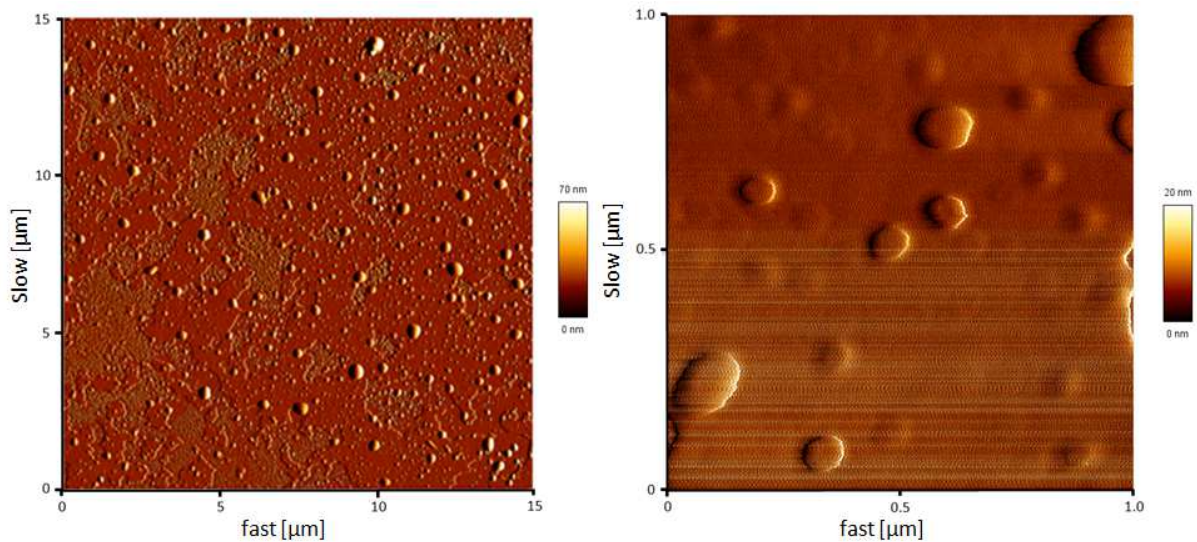


Abbildung 72: Darstellung von zwei AFM-Aufnahmen einer mit 2.5 mol-% LPS *E. coli* versetzten DMPC-MLV-Probe. Auf der linken Seite ist die unbehandelte Probe in einem größeren Maßstab dargestellt. Die rechte Seite zeigt ein einzelnes Vesikel.

5. Ergebnisse und Diskussion

Wird die Konzentration des Endotoxins LPS vom Bakterium *E. coli* auf 7.5 mol-% erhöht, sind in den AFM-Aufnahmen fast ausschließlich sich überlagernde Fragmente zu erkennen (Abbildung 73).

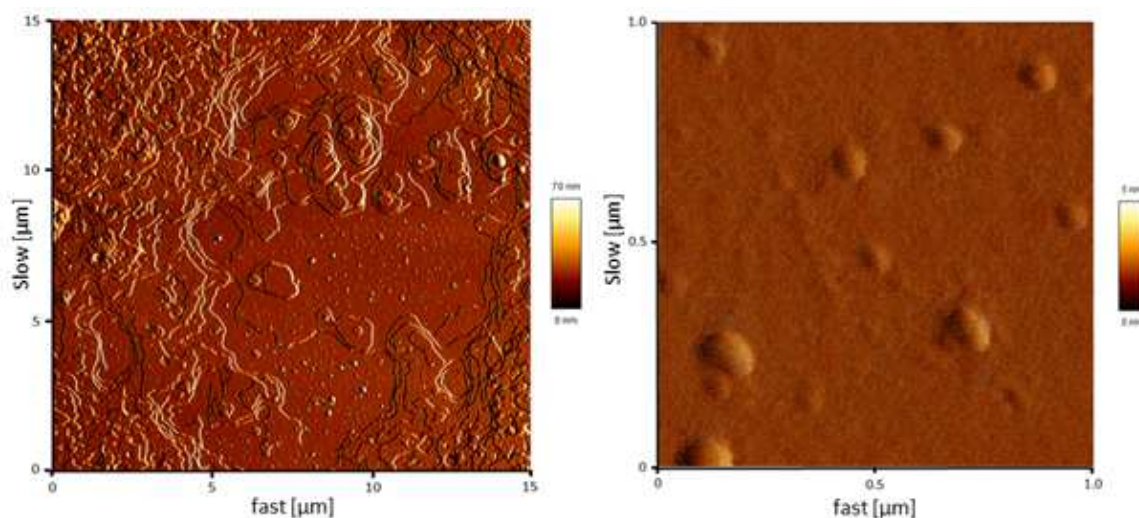


Abbildung 73: Darstellung von zwei AFM-Aufnahmen einer mit 7.5 mol-% LPS *E. coli* versetzten DMPC-MLV-Probe. Auf der linken Seite ist die unbehandelte Probe in einem größeren Maßstab dargestellt. Die rechte Seite zeigt ein einzelnes Vesikel.

Die kleinen DMPC-Vesikel, die sich bilden (Abbildung 73, rechts) werden zum größten Teil von den Fragmenten überlagert. Dadurch können multilamellare Vesikel mit definierten Durchmessern nur noch vereinzelt detektiert werden. Die sich bildenden Fragmente können zwei Ursachen haben. Zum einen ist es möglich, dass der erhöhte Anteil an LPS dazu führt, dass die „Kapazität“ der Vesikel erreicht ist und kein weiteres LPS mehr in die Membran eingebaut wird. Dadurch würden sich die LPS-Moleküle bei der Trocknung der Probe (Kapitel 4.14.) als Polymeragglomerate auf dem Substrat anlagern. Der wahrscheinlichere Fall ist, dass die DMPC-Vesikel durch die LPS-Integration ihre strukturelle Integrität verloren haben, kollabiert sind und sich als Agglomerate auf der Siliziumoberfläche angelagert haben. Dafür spricht auch ein Vergleich der AFM-Aufnahme einer mit 7.5 mol-% versetzten DMPC-Probe mit der AFM-Aufnahme einer DMPC-Doppelschicht (Abbildung 74).

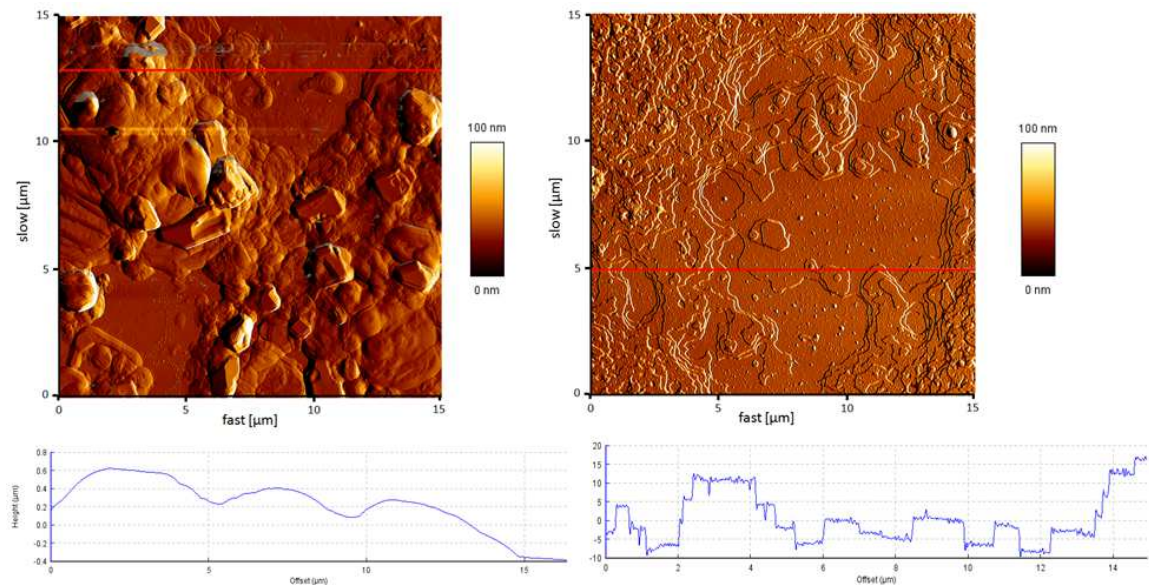


Abbildung 74: Vergleich zweier AFM-Aufnahmen einer unbehandelten DMPC-Doppelschicht (links) und von einer mit 7.5 mol-% LPS versetzten DMPC-MLV-Probe (rechts). Unterhalb der AFM-Aufnahmen sind die Höhenprofile der jeweiligen AFM-Aufnahmen dargestellt. Die rote Linie zeigt den Verlauf des Höhenprofils an.

In Abbildung 74 ist zu erkennen, dass die AFM-Aufnahmen einer DMPC-Doppelschicht der einer mit 7.5 mol-% LPS versetzten DMPC-MLV-Probe ähnelt. Die Höhenprofile geben an, dass sich in der DMPC-Doppelschicht (links) und die MLV-Probe (rechts) Stufen ausbilden. Diese stellen die Phospholipiddoppelschichten dar, die sich bei der Trocknung der Probe zusammenfallen. Die Agglomerate können bereits bei einer Konzentration von 2.5 mol-% LPS erkannt werden (Abbildung 72, links). Aus diesen Erkenntnissen lässt sich ableiten, dass durch die erhöhte LPS-Konzentration die Vesikel kollabieren und die DMPC-Fragmente sich über die kleinen sich bildenden MLV absetzen.

Um die mechanische Stabilität der Vesikel mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen zu bestimmen, wurden nach Kapitel 4.14. Nanoindentationsversuche an den DMPC-multilamellaren Vesikeln durchgeführt.

5. Ergebnisse und Diskussion

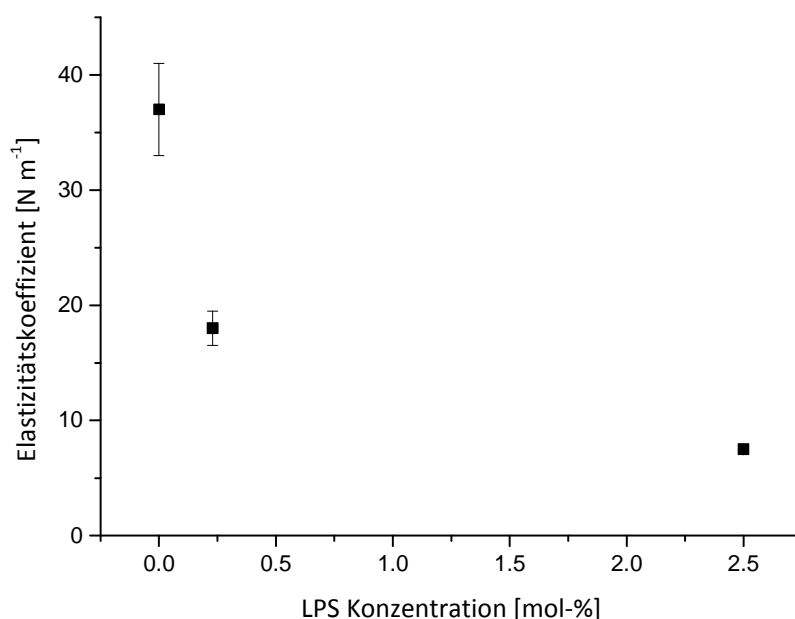


Abbildung 75: Auftragung der Elastizitätskoeffizienten gegen die jeweilige LPS-Konzentration in dem DMPC-Vesikel. Bestimmt wurden die Werte des Elastizitätskoeffizienten aus den Nanoindentationsversuchen an DMPC-MLV mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen.

Die Werte der Elastizitätskoeffizienten der multilamellaren Vesikel sind in Abbildung 75 in Abhängigkeit der LPS-Konzentration aufgetragen. In dieser Abbildung ist zu erkennen, dass der Elastizitätskoeffizient mit zunehmender LPS-Konzentration abnimmt. Diese Beobachtung ist nicht trivial, wenn angenommen wird, dass die Durchmesser der Vesikel ebenfalls bei Erhöhung der LPS-Konzentration abnehmen. Kleinere Vesikel besitzen bei gleicher Hüllenstruktur eine starrere und härtere Oberfläche als die der jeweiligen größeren Spezies. Wird der Radius einer Kugel, oder in dieser Arbeit der Radius des Vesikels verkleinert, ergibt sich daraus eine Erhöhung des Oberflächendrucks, was dazu führt, dass kleinere Vesikel härter und steifer sind als größere (siehe Herleitung in Kapitel 3.3.). In dem Fall der mit LPS versetzten DMPC-Vesikel, sind die kleineren Vesikel deutlich elastischer als die größeren ohne LPS. Ein Einbau des LPS-Moleküls in eine Zellmembran hat einen erheblichen Einfluss auf die Stabilität des gesamten Systems. Bereits kleinste Mengen des Endotoxins ziehen Veränderungen innerhalb eines Vesikels nach sich. Die Werte des Elastizitätskoeffizienten in Abbildung 75 sagen aus, dass bereits 0.23 mol-% LPS

ausreichen, um die mechanische Stabilität der Vesikel zu beeinflussen. Im Vergleich mit den unbehandelten multilamellaren Vesikel besitzen die mit LPS versetzten MLV, aufgrund des Absinkens des Wertes des Elastizitätskoeffizienten um 50%, nur noch die Hälfte an Festigkeit. Durch eine weitere Erhöhung der LPS-Konzentration von 0.23 mol-% auf 2.5 mol-% sinkt der Elastizitätskoeffizient nochmals um $10 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ ab (Abbildung 75). Für die Konzentration von 7.5 mol-% konnten keine Daten ausgewertet werden. Es ist zu vermuten, dass die MLV in diesem Bereich zu elastisch sind, sodass eine Auswertung der Messwerte nicht möglich war. Diese Beobachtungen lassen sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der charakteristischen Vesikelform bringen, als Änderungen infolge der LPS-Integration. [216]

Der Anker des LPS-Moleküls des Lipid-A Bereiches trägt zwei negativ geladene Phosphatgruppen. Wenn sich dieses Molekül in die Membran, bestehend aus DMPC, einlagert, ändert sich damit auch die Ladung der Oberfläche des Vesikels. Diese Oberflächenladung kann mit der Messung des Zeta-Potentials, wie in Kapitel 4.15. beschrieben, bestimmt werden. In Abbildung 76 sind die Zeta-Potentiale der Vesikel bei unterschiedlich zugesetzten LPS-Konzentrationen bei einem pH-Wert von 10 und einer Temperatur von 295 K abzulesen. Die exakten Daten befinden sich in Tabelle 13 in Kapitel 8.

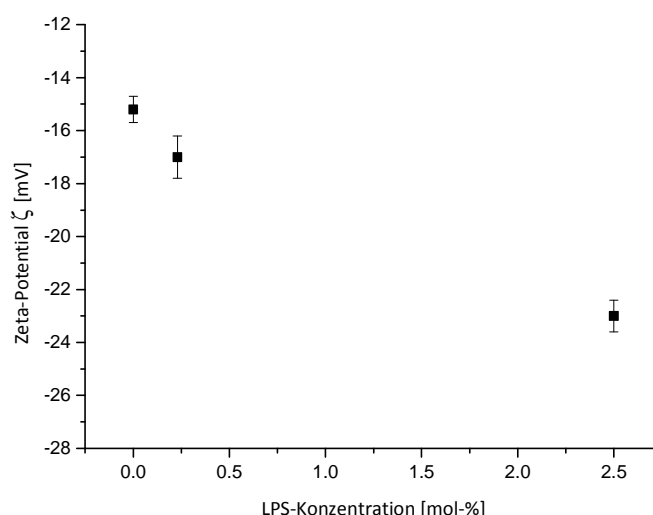


Abbildung 76: Auftragung der gemessenen Zeta-Potentiale gegen die jeweilige LPS-Konzentration in den DMPC-MLV. Gemessen wurden die Vesikel bei einem pH-Wert von 10 und einer Temperatur von 295 K.

5. Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 76 ist zu erkennen, dass durch die Zugabe von 0.23 mol-% LPS das Zeta-Potential der Vesikelmembran von einem vorherigen Wert von -15 mV auf -17 mV steigt. Nachdem der DMPC-MLV Dispersion 2.5 mol-% LPS zugesetzt wurde, steigt das Zeta-Potential der resultierenden Vesikel um mehr als 50% vom Anfangswert auf -23 mV. Die hohe Affinität der Endotoxinmoleküle gegenüber den künstlichen Zellmembranen, wie bereits bei den ^1H -PFG-NMR-Messungen in Abbildung 67 dargestellt, kann auch in den Zeta-Potential-Messungen (Abbildung 76) beobachtet werden. Bei dieser Messmethode werden keine sich frei in der Lösung bewegend Ladungsträger berücksichtigt. Das bedeutet, das Steigen des Zeta-Potentials ist allein auf die Integration der LPS-Moleküle in die Membran der Vesikel zurückzuführen. Selbst in einem Molekül-Verhältnis von 1 : 450 (LPS-Molekül : DMPC-Moleküle) beeinflusst das LPS die Oberflächenladung, sodass das Zeta-Potential um 13% ansteigt (Abbildung 76). Aufgrund des Ansteigens des Zeta-Potentials trotz der gering eingesetzten LPS-Konzentration lassen sich Rückschlüsse ziehen, die besagen, dass eine Integration der LPS-Moleküle in die Zellmembran stattgefunden hat. Die Messungen der mit 7.5 mol-% LPS versetzten DMPC-MLV haben auch mit dieser Messmethodik keine aussagekräftigen Ergebnisse liefern können.

5.3.3. Einfluss auf die strukturelle Integrität von künstlichen Zellmembranen durch bakterielle Endotoxine

Damit der Effekt des Endotoxins LPS *E. coli* auf die strukturelle Integrität einer künstlichen Zellmembran, der durch den Einbau dieses Moleküls ausgelöst wird, genauer beobachtet und analysiert werden kann, wurden Festkörper-NMR-Experimente des LPS/DMPC-Doppelschicht-Systems, wie in Kapitel 4.17. beschrieben, durchgeführt. Durch den Vergleich der Festkörper-NMR-Versuche können Aussagen über die Veränderungen der Fluktuation und der Ordnung innerhalb der Membran getroffen werden. Im Einzelnen werden in einer Versuchsreihe mehrere Messungen für vier verschiedene LPS-Konzentrationen vorgenommen.

Die ersten Festkörper-Messungen beziehen sich auf den ^{31}P -Kern im DMPC. Um den Ergebnissen eine größere biologisch/medizinische Relevanz zu verleihen, sind alle NMR-Messungen bei einer Temperatur von 310 K durchgeführt worden.

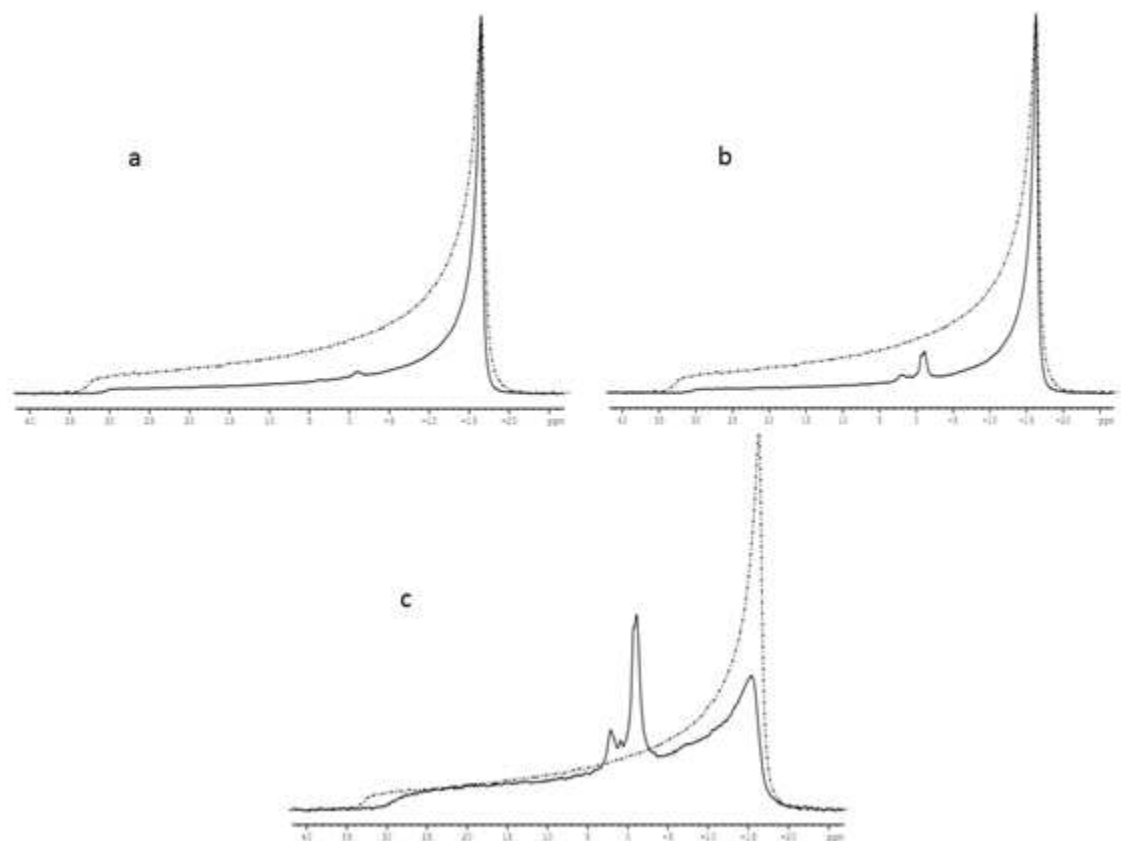


Abbildung 77: Darstellung der ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektren von DMPC-Doppelschichten (gepunktetes Spektrum entspricht unbehandelten DMPC-Doppelschichten) mit 0.23 mol-% LPS (a), 2.5 mol-% LPS (b) und 7.5 mol-% LPS. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 310 K durchgeführt.

5. Ergebnisse und Diskussion

Der untersuchte ^{31}P -Kern ist ein aussagekräftiger und sensibler Parameter, um Veränderungen in der Membran festzustellen. [217] In Abbildung 77 sind die ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektren der DMPC-Doppelschichten mit verschiedenen zugegebenen LPS-Konzentrationen dargestellt. Dabei repräsentiert Spektrum a (durchgezogene Linie) eine LPS-Konzentration von 0.23 mol-%, b von 2.5 mol-% und c von 7.5 mol-%. Die gestrichelten Linien in allen drei aufgezeigten Spektren veranschaulichen das ^{31}P -Spektrum von unbehandelten DMPC-Doppelschichten. Durch den Einbau der LPS-Moleküle in die Doppelschicht sind weitere Phosphorsignale in dem ^{31}P -Spektrum zuzuordnen (Abbildung 77 a-c). Neben dem Phosphorsignal der Phosphatgruppe (gestrichelte Linie in Abbildung 79, von -30 – 20 ppm) des DMPC (siehe Abbildung 9), werden auch die beiden Phosphatgruppen des LPS (siehe Abbildung 11) in dem Phosphor-Festkörper-NMR-Spektrum bei 0 ppm detektiert. Bei erhöhter LPS-Konzentration von 7.5 mol-% (Abbildung 77 c) sind zwei Phosphorsignale mit unterschiedlichen chemischen Verschiebungen zu beobachten. Aufgrund der unterschiedlichen räumlichen Umgebung der beiden Phosphatgruppen im LPS-Molekül (siehe Abbildung 11) ergeben sich für die Phosphorsignale dementsprechend auch zwei verschiedene Signale im ^{31}P -Spektrum (Abbildung 77 c).

Durch die Zugabe von LPS-Molekülen zu den DMPC-Doppelschichten verändert sich die Form des ^{31}P -Spektrums (Abbildung 77 a-c). Die 90 °-Flanken der ^{31}P -Spektren, welche die orthogonal zum Magnetfeld B_0 angeordneten Phosphatgruppen in der Doppelschicht darstellt (Abbildung 78), verschmälern sich für eine LPS-Konzentration von 0.23 mol-% und 2.5 mol-% (Abbildung 77 a, b). Des Weiteren verkleinert sich bei diesen Konzentrationen auch die 0 °-Flanke des Spektrums, in der sich die parallel zum Magnetfeld B_0 polarisierten Phosphatgruppen widerspiegeln (Abbildung 78).

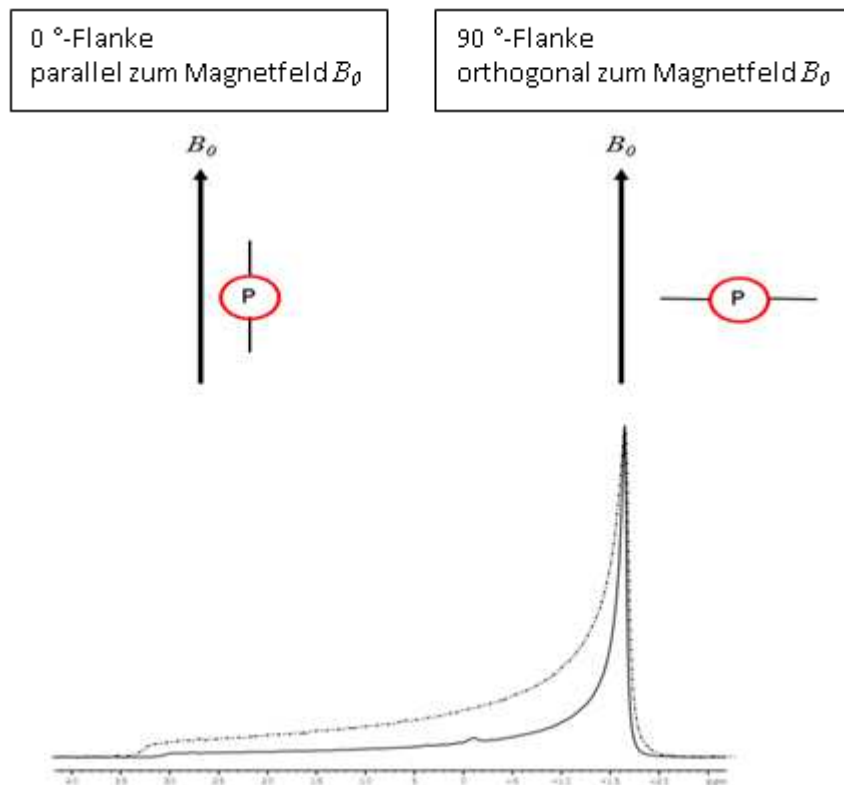


Abbildung 78: Skizzierung der Ausrichtungen der Phosphatgruppen zum Magnetfeld B_0 und deren Auswirkungen auf ein ^{31}P -Festkörper-Spektrum, anhand des NMR-Spektrums von DMPC-Doppelschichten mit 0.23 mol-% LPS.

Die Veränderungen der ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektren aus Abbildung 77 a-c sagen aus, dass das LPS-Molekül, welches sich in die DMPC-Doppelschicht eingelagert hat, einen Effekt auf die Fluktuation innerhalb der künstlichen Membran hat. Um genauere Aussagen über diesen Effekt des LPS auf die DMPC-Doppelschicht treffen zu können, wurden ^2H -Festkörper-NMR-Experimente an den künstlichen Membranen durchgeführt (Kapitel 4.17.). Diese NMR-Versuche dienen zur besseren Beschreibung der veränderten Struktur und der Rotation der DMPC-Kopfgruppe in der Zellmembran aus der Konsequenz des LPS-Einbaus.

Abbildung 79 stellt eine Zusammenfassung der ^2H -Festkörper-Spektren der DMPC-Doppelschichten mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen dar. Dabei sind, analog zu den ^{31}P -Messungen, das Spektrum der unbehandelten DMPC-Doppelschichten als gepunktete Linien und die Proben mit LPS-Zusatz mit durchgezogenen Linien dargestellt.

5. Ergebnisse und Diskussion

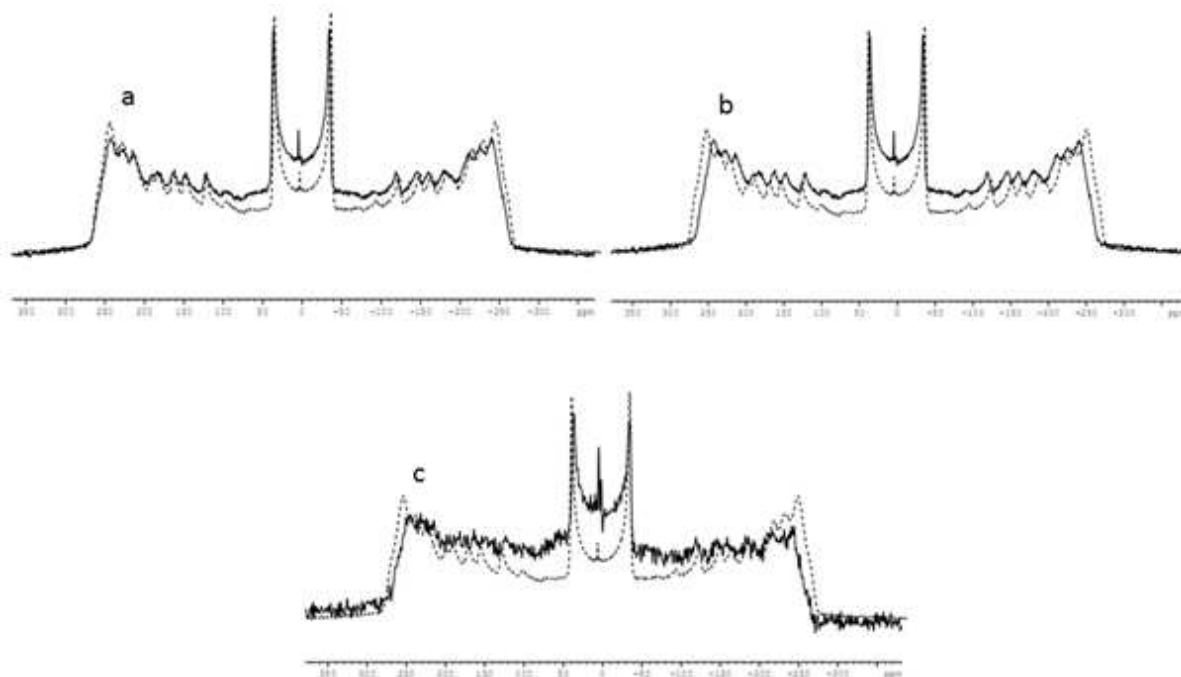


Abbildung 79: Darstellung der ^2H -Festkörper-NMR-Spektren von DMPC-Doppelschichten (gepunktetes Spektrum entspricht unbehandelten DMPC-Doppelschichten) mit 0.23 mol-% LPS (a), 2.5 mol-% LPS (b) und 7.5 mol-% LPS. Alle Messungen wurden bei einer Temperatur von 310 K durchgeführt.

Die Spektren der ^2H -Festkörper-NMR Messungen (Abbildung 79, a-c) zeigen einen Verlauf des Effektes, der durch den Lipopolysaccharid-Einbau hervorgerufen wird. Mit zunehmender LPS-Konzentration verschmälert sich die Breite des Spektrums. Die Breite des Spektrums kann im Gegensatz zur Intensität sehr genau bestimmt werden, woraus hervorgeht, dass kleine Änderungen in der Breite eines Festkörper-NMR-Spektrums große Effekte innerhalb der zu untersuchenden Substanz darstellen. Je größer die LPS-Konzentration, desto größer ist die Verschmälerung des ^2H -Festkörper-Spektrums. Um quantitative Aussagen über die erhaltenen ^2H -Festkörper-NMR-Ergebnisse zu treffen, sind die ^2H -NMR-Spektren simuliert worden (Abbildung 80). Dabei werden wie in Kapitel 3.8. beschrieben, ^2H -Festkörper-NMR-Experimente für die Signale der aliphatischen CH_2 -Gruppen des DMPC simuliert. Die endständigen CH_3 -Gruppen werden in den Simulationen nicht berücksichtigt. Daher fällt in den simulierten Spektren in Abbildung 82 die mittlere Signalgruppe aus den experimentellen Spektren weg. Aufgrund der viel kürzeren T_2 -Zeit des DMPC als die gewählten Korrelationszeiten von τ , ergeben sich für die simulierten Spektren in Abbildung 80 keine weiteren Veränderungen innerhalb eines Ordnungsparameters S_{zz} (horizontaler Verlauf der

simulierten Spektren innerhalb eines Ordnungsparameters). Dennoch mussten die Korrelationszeiten in dieser Größenordnung gewählt werden, um die simulierten den experimentell gemessenen Spektren anzupassen.

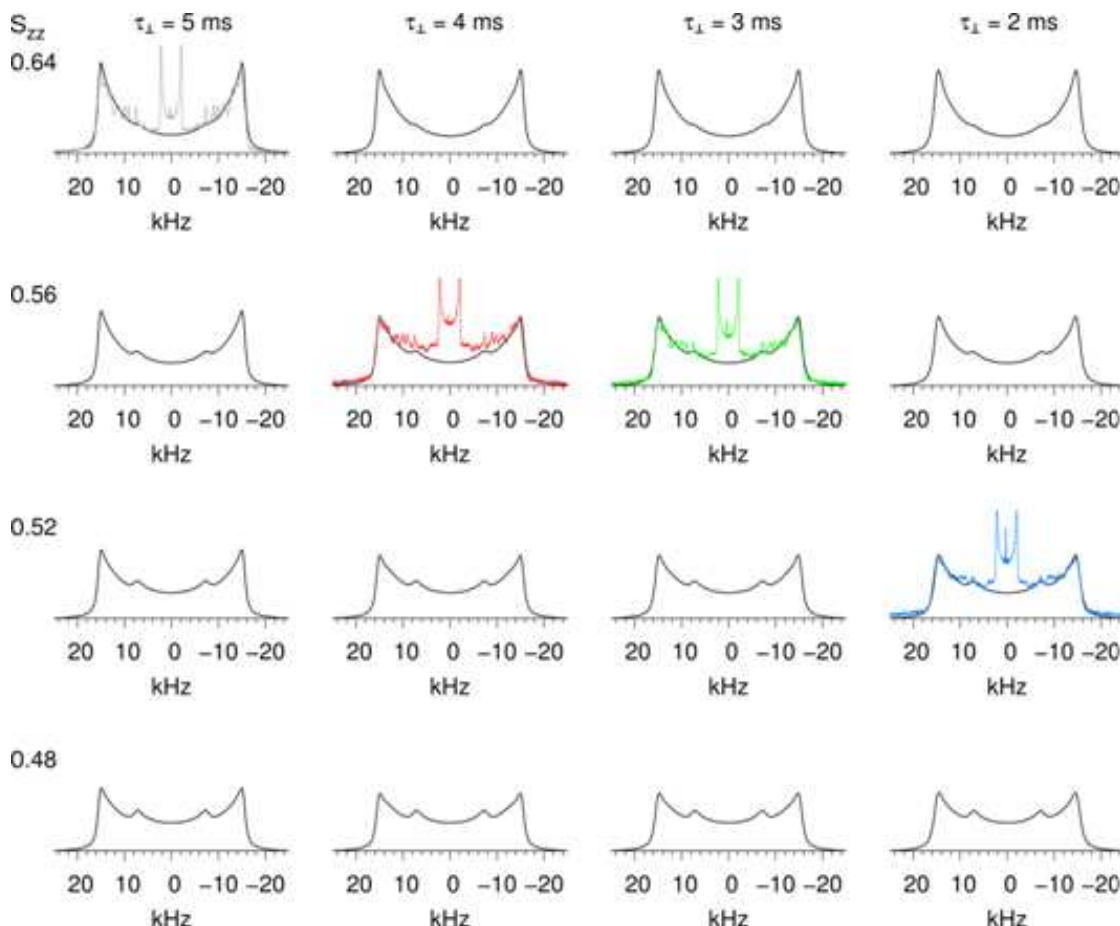


Abbildung 80: Zusammenfassung der simulierten (schwarz) und der experimentell (farbig) bestimmten ^2H -Festkörper-NMR-Spektren. Des Weiteren ist der Ordnungsparameter S_{ZZ} und die Korrelationszeit τ die in den Simulationen variiert wurden dargestellt. Die experimentellen Spektren der DMPC-Doppelschichten enthalten in aufsteigender Reihenfolge 0 mol-% LPS (grau), 0.23 mol-% LPS (rot), 2.5 mol-% LPS (grün), und 7.5 mol-% LPS (blau).

In Abbildung 80 werden die simulierten mit den experimentell gemessenen ^2H -Festkörper-NMR-Spektren verglichen. Von oben nach unten nimmt der Ordnungsparameter, der bei den Simulationen variiert wurde, ab. Die Spektren wurden mit dem Programm NMR-SMILED (siehe Kapitel 3.8.) simuliert. Dabei wurde der Ordnungsparameter dahingehend variiert, dass die simulierten Spektren den experimentell ermittelten ^2H -Festkörper-Spektren (farbige Spektren in Abbildung 80) angefitet werden konnten. In Abbildung 80 ist zu erkennen, dass bei einem Vergleich

5. Ergebnisse und Diskussion

der experimentellen mit den simulierten Spektren bei der Erhöhung der LPS-Konzentration der Ordnungsparameter S_{zz} von 0.64 auf 0.52 sinkt. Daraus ergibt sich bei erhöhter LPS-Konzentration eine verringerte Ordnung innerhalb der DMPC-Doppelschichten. Des Weiteren ist ersichtlich, dass die Korrelationszeit τ_L von 5 ms auf 2 ms abgesenkt werden muss, um die simulierten Spektren den der experimentell gemessenen Spektren anzupassen. Diese Verringerung der Korrelationszeiten ist in den Spektren bei Erhöhung der LPS-Konzentration als eine Erosion der äußeren Flanken zu erkennen (Abbildung 80). Eine Integration des bakteriellen Endotoxins LPS erhöht die Geschwindigkeit der Rotation der DMPC-Kopfgruppe. Diese Erkenntnis und die Resultate der schwindenden mechanischen Stabilität der Membran aus Kapitel 5.3.2. erzeugen das Bild einer Erhöhung der Fluktuation innerhalb der Membran. Somit kann aus den Ergebnissen der Festkörper-NMR-Experimente geschlossen werden, dass das LPS die Orientierung der Phospholipide der Doppelschicht dahingehend stört, dass die Membran aufgrund der höheren Fluktuation und der herabgesetzten molekularen Ordnung weicher wird.²

² Die Simulationen sind von Frau Moegle-Hofacker vom Institut für Technische Chemie der Universität Stuttgart durchgeführt worden.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Diese Arbeit gibt ein Bild über das Verhalten von zwei biologischen Systemen in einer Stresssituation. Dafür wurde der Biofilm des Bakteriums *D. geothermalis* einer Trockenperiode ausgesetzt und in eine Biomembran ist das bakterielle Lipopolysaccharid LPS integriert worden.

Das biofilmproduzierende Bakterium *D. geothermalis* ist der passende Mikroorganismus für die Erforschung des Lebens außerhalb unseres Planeten. Um den Antworten auf die Frage nach dem Ursprung des Lebens und dem Leben außerhalb der Erde einen weiteren Schritt näher zu kommen sind die Erkenntnisse über die Lebensweise solcher Bakterien von großem Interesse. Ein zentraler Gesichtspunkt dieser Untersuchung ist die Wechselwirkung der extrazellulären polymeren Substanzen mit dem in der Matrix eingeschlossenem Wasser. Die Beobachtung der morphologischen Änderungen des Biofilms im Falle einer Trockenperiode steht genauso im Mittelpunkt des Interesses wie die Effekte des Wassermangels auf die Elastizität der sich bildenden Schutzhaut. Auf Basis der gewonnen Resultate wurde ein Modell erzeugt und beschrieben, das zu verstehen hilft, wie ein Biofilm mit extremen Umweltbedingungen umgeht.

Die Verwendung von Algenalginat als Modellsystem wurde für die Untersuchungen von EPS-Einflüssen etabliert. In der Polymermatrix finden sich eine schnelle und eine langsame Wasserfraktion wieder. Durch die Benutzung des Alginats in seiner reinen Form wurde es möglich, den Einfluss der Polysaccharide auf die Wasserspeicherung zu analysieren. Dabei wurde Algenalginat acetyliert, um die Polarität von bakteriellem Alginat nachzubilden. Bei der Übertragung auf das komplexe Biofilmsystem ergibt sich das Bild, dass die Bakterien im Laufe der Evolution mit den EPS eine Schutzmaßnahme entwickelt haben, um bei einer gegebenen Trockenheit genug Wasser im Inneren zu speichern. Ohne äußere Wasserzufuhr trocknet zuerst die obere Schicht des Biofilms aus. Durch das Verdunsten der Wassermoleküle bildet sich eine Art Schutzhaut auf der Oberfläche des Biofilms. Die Verdunstung des Wassers wird dadurch zwar nicht vollständig gestoppt aber doch stark verlangsamt. Auch in einem komplexen

6. Zusammenfassung und Ausblick

System, wie einem Biofilm, sind zwei Wasserspezies nachgewiesen worden. Die Ergebnisse der Rehydratisierungsversuche mit dem auf einem R2A-Agar gewachsenen Biofilm zeigen, dass es möglich ist, das System bestehend aus EPS und Mikroorganismen im Labormaßstab zu rehydratisieren. Mittels AFM-Bildgebung und Nanoindentationsversuche kann belegt werden, dass die Trockenperiode den Bakterien zusetzt, sie sich aber auch von den belastenden Umweltbedingungen wieder erholen können. Der Elastizitätskoeffizient der Oberfläche des trocknenden Biofilms nimmt mit steigender Trocknungszeit zu. Diese Resultate entsprechen den oben postulierten Vorgängen der sich bildenden Schutzhaut während einer Trockenperiode. Durch die Rehydratisierung quellen die Bakterienzellen wieder weiter auf und die Polysaccharide binden wieder Wasser. Die Werte des Elastizitätskoeffizienten des Biofilms sinken wieder.

Auf der Oberfläche von Bakterien befinden sich nicht nur EPS sondern auch sogenannte Lipopolysaccharide (LPS). Diese Moleküle sitzen direkt an der oberen Zellmembran von gramnegativen Bakterien. Sie dienen den Bakterien als Botenstoffe und als Antigene. Beim Absterben eines dieser gramnegativen Bakterien werden diese Lipopolysaccharide freigesetzt. Allgemein war bis jetzt bereits bekannt, dass das LPS des Bakteriums *Escherichia coli* einen endotoxinischen Effekt hat. Es bindet an den TLR-4 Rezeptor und löst dadurch eine Reaktionskaskade innerhalb der Zellen aus, die eine Reaktion auf eine Entzündung nach sich ziehen. Diese Arbeit geht noch einen Schritt weiter und untersucht den Effekt dieses Endotoxins auf die strukturelle Integrität von menschlichen roten Blutkörperchen, den Erythrozyten.

Mit der PFG-NMR wurde eine Integration der LPS-Moleküle in eine künstliche Zellmembran nachgewiesen. Das LPS wurde dafür im ersten Schritt im reinen Zustand und im zweiten Schritt mit DMPC-d₅₄ versetzt gemessen. Dabei ergibt sich das Bild, dass das LPS ohne DMPC zwei verschiedene Selbstdiffusionskoeffizienten aufweist. Das spricht für zwei unterschiedliche Strukturen innerhalb der Lösung. Bei der Zugabe der DMPC-d₅₄-MLVs verschwindet die schnelle Fraktion und es bleibt nur noch ein einzelner Diffusionskoeffizient übrig. Das bedeutet, dass die LPS Moleküle in ein großes System, in diesem Fall in ein multilamellares Vesikel aus DMPC eingebaut wurden, da alle LPS

Moleküle dieselbe Umgebung spüren. Je größer die LPS-Konzentration in einem DMPC-MLV ist, desto kleiner werden die resultierenden Vesikel. Bis zu einer Konzentration von 7.5 mol-% LPS hat diese Regel seine Gültigkeit. Danach sind nur noch sehr kleine Vesikel zu erkennen. Das bedeutet, dass ab einer Konzentration von 7.5 mol-% LPS die Vesikel keine Stabilität mehr aufbringen können um den Ultraschallkavitäten während der Synthese standzuhalten. Die MLV werden mit zunehmender LPS-Konzentration weicher und instabiler. Durch eine erhöhte LPS-Konzentration sinken die Werte des Elastizitätskoeffizienten ab. Die ^{31}P - und ^2H -Festkörper-Spektren der DMPC-Doppelschichten zeigen eine erhöhte Fluktuation innerhalb der Membran durch die erhöhte LPS-Zugabe. Das Sinken des Ordnungsparameters bestätigt des Weiteren die These, dass die Membran durch die „Vergiftung“ mit den LPS-Endotoxinen mechanisch geschwächt wird.

Schlussendlich kann mit den Ergebnissen dieser Arbeit bestätigt werden, dass das Lipopolysaccharid des Bakteriums *E. coli* nicht nur einen Effekt auf die Rezeptoren der menschlichen Zellen, sondern auch einen gravierenden Einfluss auf die Stabilität der Membran der roten Blutkörperchen hat. Diese Resultate sind nur ein erster Schritt auf dem Weg zum Verständnis solcher bakterieller Angriffe auf den menschlichen Körper. In weiteren Arbeiten wäre es möglich die genaue Position der Endotoxine in der Zellmembran zu untersuchen. [219] Des Weiteren ist es von Interesse Strategien oder Methoden zu entwickeln, um solch einen Angriff von LPS-Molekülen auf die Erythrozyten zu verhindern.

7. Literaturverzeichnis

- [1] K. Kashefi, D.E. Holmes, J.A. Baross, D.R. Lovley, Thermophily in the Geobacteraceae: *Geothermobacter ehrlichii* gen. nov., sp. nov., a Novel Thermophilic Member of the Geobacteraceae from the "Bag City" Hydrothermal Vent, *Applied and Environmental Microbiology* 69 (2003) 2985–2993.
- [2] K. Kashefi, D.R. Lovley, Extending the upper Temperature Limit for Life, *Science* (2003) 934.
- [3] H.-C. Flemming, J. Wingender, Extrazelluläre polymere Substanzen (EPS)-der Baustoff für Biofilme, *Vom Wasser* (2000) 245–266.
- [4] G. Furth, Untersuchung der Wechselwirkungen von ökologisch relevanten bi- und trivalenten Metallionen in bakteriellen EPS. Dissertation, 2006.
- [5] A. Straatman, Bestimmung physikalisch-chemischer Eigenschaften von Alginatlösungen und -gelen und von Lösungen Extrazellulärer Polymerer Substanzen von *Pseudomonas aeruginosa* SG81 mit der Analytischen Ultrazentrifuge. Dissertation, 2003.
- [6] D.G. Allison, I.W. Sutherland, The Role of Exopolysaccharides in Adhesion of Freshwater Bacteria, *Microbiology* 133 (1987) 1319–1327.
- [7] K.S. Makarova, M.V. Omelchenko, E.K. Gaidamakova, V.Y. Matrosova, A. Vasilenko, M. Zhai, A. Lapidus, A. Copeland, E. Kim, M. Land, K. Mavrommatis, S. Pitluck, P.M. Richardson, C. Detter, T. Brettin, E. Saunders, B. Lai, B. Ravel, K.M. Kemner, Y.I. Wolf, A. Sorokin, A.V. Gerasimova, M.S. Gelfand, J.K. Fredrickson, E.V. Koonin, M.J. Daly, *Deinococcus geothermalis*: the pool of extreme radiation resistance genes shrinks, *PloS one* 2 (2007) e955.
- [8] A. Kulp, M.J. Kuehn, Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles, *Annual review of microbiology* 64 (2010) 163–184.
- [9] S. Rivest, Lacroix, S., Vallières, L., S. Nadeau, J. Zhang, N. Laflamme, How the blood talks to the Brain Parenchyma and the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus During Systemic Inflammatory and Infectious Stimuli, *Society for experimental Biology and Medicine* (2000) 22–38.
- [10] R.J. Doyle, *Biofilms*, Academic Press, San Diego, 1999.
- [11] N.J. Russel (Ed.), *Pseudomonas infection and alginates*, Chapman and Hall, New York, 1990.
- [12] J.W. Costerton, K.-J. Cheng, G.G. Geesey, T.I. Ladd, J.C. Nickel, M. Dasgupta, T.J. Marrie, Bacterial biofilms in nature and disease, *Annual review of microbiology* (1987) 435–464.
- [13] W.G. Characklis, K.C. Marshall, *Biofilms*, Wiley, New York, 1990.
- [14] P. Tielen, Einfluss extrazellulärer Enzyme auf die Struktur und die Eigenschaften von Biofilmen von *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertation, 2005.
- [15] C.W. Keevil, J. Roger, J.T. Walker, *Microbiol Eur.* (1995) 10–14.
- [16] Graham, N. J. D. (Ed.), *Slow sand filtration: recent development in water treatment technology*, Ellis Horwood Publ., Chichester, 1988.
- [17] S. Gratiser, E. Ulrich, *Einsatz umweltverträglicher Chemikalien in der Kühlwasserkonditionierung*, Berlin, 2002.
- [18] T. Windhüs, Physikalisch-chemische Charakterisierung von extrazellulären polymeren Substanzen und deren Alginatkomplexen mit Streulichtmethoden. Dissertation, 2002.
- [19] H.-C. Flemming, *Biofilme, Biofouling und mikrobielle Schädigung von Werkstoffen*. Habilitationsschrift, 1994.

- [20] K. Jann, B. Jann, Bacterial polysaccharide antigens. In: Sutherland, I. W. (eds.): Surface carbohydrates of the procaryotic cell, Academic Press, New York, 1977.
- [21] M.M. Flechter (Ed.), The Physiological Activity of Bacteria Attached to Solid Surfaces, Elsevier, 1991.
- [22] A. Rode, Isolierung und Charakterisierung von bakteriellen extrazellulären polymeren Substanzen aus Biofilmen. Dissertation, 2004.
- [23] H.-C. Flemming, J. Wingender, Biofilme — die bevorzugte Lebensform der Bakterien: Flocken, Filme und Schlämme, Biologie in unserer Zeit 31 (2001) 169–180.
- [24] LaRivière, J. W. M., The production of surface active compounds by micro-organisms and its possible significance in oil recovery, Antonie van Leeuwenhoek 1 (1955) 1–27.
- [25] N. Levy, S. Magdassi, Y. Bar-Or, Physio-chemical aspects in flocculation of bentonite suspensions by a cyanobacterial bioflocculant, Water Res. 2 (1992) 249–254.
- [26] Y. Okami, Marine microorganisms as a source of bioactive agents, Microbiol Ecol. (1986) 65–78.
- [27] N. Emmerich, Untersuchung der Wechselwirkung von Mangan- und Calciumionen mit Alginat von Algen verschiedener mucodien Stämmen des Bakteriums Pseudomonas aeruginosa. Dissertation, 2004.
- [28] G.O. Aspinall, Polysaccharides, Pergamon Press Ltd., Oxford, 1970.
- [29] W. Pilnik, F. Voragen, Polysaccharide. In: Ullmann's Enzyklopädie der technischen Chemie, 19th ed., Verlag Chemie, 1980.
- [30] G. Franz, Polysaccharide, Springer Verlag, Berlin, 1991.
- [31] C. Wandrey, Polyelektrolyte – Makromolekulare Parameter und Elektrolytverhalten. Habilitationsschrift, 1996.
- [32] Atkins, E. D. T., Polysaccharides, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1985.
- [33] W. Buchard, Polysaccharide, Springer Verlag, Berlin, 1985.
- [34] M. Fertah, A. Belfkira, E.m. Dahmane, M. Taourirte, F. Brouillette, Extraction and characterization of sodium alginate from Moroccan Laminaria digitata brown seaweed, Arabian Journal of Chemistry (2014).
- [35] J. Sprung, Algen, Dähne Verlag, Ettlingen, 2002.
- [36] U. Sommer, Algen, Quallen Wasserfloh, Springer Verlag, Berlin, 1996.
- [37] B.P. Kremer, Helgoländer wiss. Meeresunters (1975) 115–127.
- [38] W. Braune, Meeresalgen. Ein Farbbildführer zu verbreiteten benthischen Grün-, Braun-, und Rotalgen der Weltmeere, Gantner; Koeltz (Vertrieb), Vaduz, Königstein, 2008.
- [39] D.G. Müller, Generationswechsel, Kernphasenwechsel und Sexualität der Braunalge Ectocarpus siliculosus im Kulturversuch, Planta 1 (1967) 39–54.
- [40] G. Ebert, Biopolymere, B.G. Teubner, Stuttgart, 1993.
- [41] W. Nultsch, Allgemeine Botanik, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1996.
- [42] L. Lianghin, F. Yapeng, R. Vreeher, Appelqvist I., Reexamining the Egg-Box Model in Calcium-Alginate Gels with X-Ray Diffraction, Biomacromolecules (2007) 464–468.
- [43] I. Braccini, S. Pèrez, Molecular Basis of Ca²⁺-Induced Gelation in Alginates an Pectins: The Egg-Box Model Revisited, Biomacromolecules (2001) 1089–1096.
- [44] D. Lattner, Untersuchung schwacher Wechselwirkungen innerhalb von Biofilmen mittels ¹³C- NMR - Spektroskopie. Dissertation, 2003.
- [45] S.C. Kiong, P.A. Williams, New Insights into the Mechanism of Gelation of Alginate and Pectin: Charge Annihilation and Reversal Mechanism, Biomacromolecules (2005) 939–969.

7. Literaturverzeichnis

- [46] Y. Fang, S. Al-Assaf, G.O. Phillips, K. Nishinari, T. Funami, P.A. Williams, L. Li, Multiple Steps and Critical Behavior of the Binding of Calcium to Alginate, *Journal of physical chemistry* (2007) 2456–2462.
- [47] P.J. Flory, Introductory lecture, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 57 (1974) 7.
- [48] M. Lechtenfeld, Auswertung der rheologischen und optischen Untersuchungen während der Gelierung des Systems Gelatine / Wasser mit Hilfe der Perkolationstheorie. Dissertation, 2001.
- [49] J.R. Lawrence, D.R. Korber, B.D. Hoyle, J.W. Costerton, D.E. Caldwell, Optical sectioning of microbial biofilms, *J. Bacteriology* (1991) 6558–6567.
- [50] H. Brim, A. Venkateswaran, H.M. Kostandarithes, J.K. Fredrickson, M.J. Daly, Engineering *Deinococcus geothermalis* for Bioremediation of High-Temperature Radioactive Waste Environments, *Applied and Environmental Microbiology* 69 (2003) 4575–4582.
- [51] M. Peltola, T.R. Neu, M. Raulio, M. Kolari, M.S. Salkinoja-Salonen, Architecture of *Deinococcus geothermalis* biofilms on glass and steel: a lectin study, *Environmental microbiology* 10 (2008) 1752–1759.
- [52] A.C. Ferreira, M.F. Nobre, F.A. Rainey, M.T. Silva, R. Wait, J. Burghardt, A.P. Chung, Da Costa, M. S., *Deinococcus geothermalis* sp. nov. and *Deinococcus murrayi* sp. nov., Two Extremely Radiation-Resistant and Slightly Thermophilic Species from Hot Springs, *International Journal of Systematic Bacteriology* 47 (1997) 939–947.
- [53] M. Peltola, C. Kanto Oqvist, J. Ekman, M. Kosonen, S. Jokela, M. Kolari, P. Korhonen, M. Salkinoja-Salonen, Quantitative contributions of bacteria and of *Deinococcus geothermalis* to deposits and slimes in paper industry, *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 35 (2008) 1651–1657.
- [54] M. Kolari, U. Schmidt, E. Kuismanen, M.S. Salkinoja-Salonen, Firm but Slippery Attachment of *Deinococcus geothermalis*, *Journal of Bacteriology* 184 (2002) 2473–2480.
- [55] C. Saarimaa, M. Peltola, M. Raulio, T.R. Neu, M.S. Salkinoja-Salonen, P. Neubauer, Characterization of adhesion threads of *Deinococcus geothermalis* as type IV pili, *Journal of Bacteriology* 188 (2006) 7016–7021.
- [56] C. Liedert, M. Peltola, J. Bernhardt, P. Neubauer, M. Salkinoja-Salonen, Physiology of resistant *Deinococcus geothermalis* bacterium aerobically cultivated in low-manganese medium, *Journal of Bacteriology* 194 (2012) 1552–1561.
- [57] D. Boujard, *Zell- und Molekularbiologie im Überblick*, Springer Spektrum, Berlin, 2014.
- [58] Heinrich, P. C., Löffler, G., P.E. Petrides (Eds.), *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer Verlag, Berlin, 2014.
- [59] G. Gompper, M. Schick, *Soft Matter. Lipid Bilayers and Red Blood Cells*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2008.
- [60] A. Faller, M. Schünke, *Der Körper des Menschen : Einführung in Bau und Funktion*, Thieme, Stuttgart, 2012.
- [61] K.-H. Nave, *Unsere Nervenzellen - die materielle Basis des Verstandes und der Erinnerung : eine Einführung in die Erkenntnisse und die Begriffswelt der Neurowissenschaft*, Frieling, Berlin, 2008.
- [62] G.L. Nicolson, The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years, *Biochimica et biophysica acta* 1838 (2014) 1451–1466.

- [63] <http://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/EMZellmembran.html>, Aufgerufen am 20.02.2015 um 12.36 Uhr MEZ.
- [64] R.B. Leslie, D. Chapman, Artificial phospholipid membranes and bioenergetics, *Chem. Phys. Lipids* (1967) 143–156.
- [65] P. Mueller, D.O. Rudin, H.T. Tien, W.C. Wescott, Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into excitable system, *Nature* (1962) 979–980.
- [66] J.F. Danielli, H. Davson, A contribution to the theory of permeability of thin films, *J. Cell. Comp. Physiol.* 5 (1935) 495–508.
- [67] E. Gorter, F. Grendel, ON BIMOLECULAR LAYERS OF LIPOIDS ON THE CHROMOCYTES OF THE BLOOD, *Journal of Experimental Medicine* 41 (1925) 439–443.
- [68] F.A. Henn, T.E. Thompson, Synthetic lipid bilayer membranes, *annu. rev. biochem.* (1969) 241–262.
- [69] G. Adam, P. Lugner, G. Stark, *Physikalische Chemie und Biophysik*, Springer Verlag, Berlin, 1995.
- [70] S.J. Singer, G.L. Nicolson, The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, New Series (1972) 720–731.
- [71] S.A. Baeurle, J. Kroener, Modelling effective interactions of micellar aggregates of ionic surfacants with the Gauss-Core potential, *J. Math. Chem.* (2004) 409–421.
- [72] W. Linß, *Histologie. Zytologie, allgemeine Histologie, mikroskopische Anatomie*, de Gruyter, Berlin [u.a.], 1999.
- [73] H. Fang, Inflammation, SIRS and Sepsis after hepatobiliary surgery: Is lipopolysaccharide binding protein the link? Dissertation, 2012.
- [74] Raetz, C. R. H., Biochemistry of endotoxins, *annu. rev. biochem.* (1990) 129–170.
- [75] Raetz, C. R. H., C.M. Reynolds, M.S. Trent, R.E. Bishop, Lipid A modification systems in gram-negative bacteria, *Annual review of biochemistry* 76 (2007) 295–329.
- [76] A. Skalli, M. Castillo, K.B. Andree, L. Tort, D. Furones, E. Gisbert, The LPS derived from the cell walls of the Gram-negative bacteria *Pantoea agglomerans* stimulates growth and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles, *Aquaculture* 416-417 (2013) 272–279.
- [77] J.X. Huang, Azad, M. A. K, E. Yuriev, M.A. Baker, R.L. Nation, J. Li, M.A. Cooper, T. Velkov, Molecular Characterization of Lipopolysaccharide Binding to Human α -1-Acid Glycoprotein, *Journal of lipids* 2012 (2012) 475153.
- [78] A.P. Moran, M.M. Prendergast, B.J. Appelmelk, Molecular mimicry of host structures by bacterial lipopolysaccharides and its contribution to disease, *Immunology and Medical Microbiology* (1996) 105–115.
- [79] R. Tamai, Y. Asai, M. Hashimoto, F. Fukase, S. Kusumoto, H. Ishida, M. Kiso, T. Ogawa, Cell activation by monosaccharide lipid A analogues utilizing Toll-like receptor 4, *Immunology and Medical Microbiology* (2003) 66–72.
- [80] E.T. Rietschel, H. Brade, L. Brade, K. Brandenburg, U. Schade, U. Seydel, Lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides: relation of chemical structure to biological activity, *Progress in clinical and biological research* (1987) 25–53.
- [81] E.T. Rietschel, U. Seydel, U. Zahringer, U. Schade, L. Brade, H. Loppnow, Bacterial endotoxin: molecular relationships between structure and activity, *Infectious disease clinics of North America* (1991) 753–779.

7. Literaturverzeichnis

- [82] U. Zähringer, B. Lindner, E.T. Rietschel, Molecular Structure of Lipid a, the Endotoxic Center of Bacterial Lipopolysaccharides, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* (1994) 211–276.
- [83] R.C. Bone, R.A. Balk, F.B. Cerra, R.P. Dellinger, A.M. Fein, W.A. Knaus, Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis, *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine, CHEST* (1992) 1644–1655.
- [84] J. Klena, P. Zhang, O. Schwartz, S. Hull, T. Chen, The Core Lipopolysaccharide of *Escherichia coli* Is a Ligand for the Dendritic-Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule Nonintegrin CD209 Receptor, *Journal of Bacteriology* 187 (2005) 1710–1715.
- [85] K.L. Lohmann, M. Vandenplas, M.H. Barton, J.N. Moore, Lipopolysaccharide from *Rhodobacter sphaeroides* is an agonist in equine cells, *Journal of endotoxin research* 9 (2003) 33–37.
- [86] K.L. Irvine, M. Gangloff, C.M. Walsh, D.R. Spring, N.J. Gay, C.E. Bryant, Identification of key residues that confer *Rhodobacter sphaeroides* LPS activity at horse TLR4/MD-2, *PloS one* 9 (2014) e98776.
- [87] G.D. Kutuzova, R.M. Albrecht, C.M. Erickson, N. Qureshi, Diphosphoryl Lipid A from *Rhodobacter sphaeroides* Blocks the Binding and Internalization of Lipopolysaccharide in RAW 264.7 Cells, *The Journal of Immunology* 167 (2001) 482–489.
- [88] S. Gál, F. Paulik, E. Pell, H. Puxbaum, Thermoanalytical investigation on dust, *z. Anal. chem.* (1976) 291–295.
- [89] G. Schwedt, *Analytische Chemie*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2008.
- [90] H.B. Callen, *Thermodynamics and an introduction to thermostatics*, 2nd ed., J. Wiley, New York, Chichester [etc.], op. 1985.
- [91] R.R. Rogers, M.K. Yau, *A short course in cloud physics*, 3rd ed., Butterworth-Heinemann, Oxford, Boston, 1989.
- [92] G. Wedler, *Lehrbuch der physikalischen Chemie*, 5th ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2004.
- [93] P.W. Atkins, J.d. Paula, *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2006.
- [94] W. Nernst, E.H. Riesenfeld, *Über quantitative Gewichtsanalyse mit sehr kleinen Substanzmengen*, 1903.
- [95] C.D. Duval, *Inorganic Thermogravimetric Analysis*, Elsevier, Amsterdam, 1963.
- [96] K. Kettrup, *Thermogravimetrie-Differensthermoanalyse*, in: *Analytiker-Taschenbuch*, Springer Verlag, Berlin, 1984.
- [97] É. Buzágh-Gere, J. Simon, S. Gál, Characterization of Differently Bound Water by means of the constants of thermal decomposition kinetics, *z. Anal. chem.* (1973) 392–396.
- [98] W.F. Hemminger, H.K. Cammenga, *Methoden der Thermischen Analyse*, Springer Verlag, Berlin, 1989.
- [99] C.M. Earnest, *Compositional Analysis by Thermogravimetry*, American Society for testing and materials, Baltimore, 1988.
- [100] R.C. Mielenz, N.C. Schieltz, M.E. King, *Thermogravimetric Analysis of Clay and Clay-Like Minerals*, *Clays and Clay Minerals* (1953) 285–314.
- [101] K. Heide, *Dynamisch thermische Analysmethoden*, Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 1982.
- [102] E.S. Watson, M.J. O'Neill, J. Justin, N. Brenner, *A differential Scanning calorimeter for quantitative differential thermal analysis*, The Perking-Elmer Corporation, Norwalk, 1964.

- [103] W.F. Hemminger, G. Höhne, Grundlagen der Kalorimetrie, Verlag Chemie, Weinheim, 1979.
- [104] M. Kasper, G.W.H. Höhne, W.F. Hemminger, H.-J. Flammersheim: Differential scanning calorimetry, *Anal Bioanal Chem* 380 (2004) 366–367.
- [105] A.P. Gray (Ed.), *Analytical Calorimetry*, Plenum Press, New York, 1968.
- [106] C. Schick, Differential scanning calorimetry (DSC) of semicrystalline polymers, *Analytical and bioanalytical chemistry* 395 (2009) 1589–1611.
- [107] G. Höhne, *Mikrokalorimetrie*, Analytiker-Taschenbuch, Springer Verlag, Berlin, 1984.
- [108] G. Höhne, W.F. Hemminger, H.-J. Flammersheim, *Differential Scanning Calorimetry*, Springer Verlag, Berlin, 1996.
- [109] M. Otto, *Analytische Chemie*, 4th ed., Wiley-VCH, Weinheim, Bergstr, 2011.
- [110] U.R. Kunze, G. Schwedt, *Grundlagen der quantitativen Analyse*, 6th ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2009.
- [111] L. Sommer, *Analytical absorption spectro-photometry in the visible and ultraviolet: the principles*, Elsevier, Amsterdam, 1989.
- [112] G. Rücker, M. Neugebauer, G.G. Willems, *Instrumentelle pharmazeutische Analytik. Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen und elektrochemischen Analysemethoden*, Wiss. Verlagsges., Stuttgart, 1988.
- [113] <http://www.chemie.uni-kl.de/fachrichtungen/oc/kubik/index.php?lan=rvfcvsjjd&sca=la&lev1=0tea&lev2=oc3&lev3=uvv&lev4=gru>, Aufgerufen am 13.02.2015 um 12.58 MEZ.
- [114] W.E. Steger, *Strukturanalytik Kapitel 4 Elektronenanregungsspektroskopie*, Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 1992.
- [115] G. Binnig, C.F. Quate, Atomic Force Microscope, *Physical Review Letters* 9 (1986) 930–933.
- [116] C. Rotsch, *Elastizitätsmessungen an lebenden Zellen mit den Rasterkraftmikroskop*. Dissertation, 1999.
- [117] A. Zellermann, *Strukturveränderungen anionischer Polysaccharide in Gegenwart mehrwertiger Kationen*. Dissertation, 2012.
- [118] D.V. Kazantsev, E.A. Kazantsev, A four.segment photodiode cantilever-bending sensor for an atomic-force microscope, *Instruments and Experimental Techniques* 5 (2014) 631–639.
- [119] T. Keller, G. Wie, *Grundlagen der Rasterkraftmikroskopie*. Materialkundliches Praktikum, 2011.
- [120] J. Vesenska, S. Manne, R. Giberson, T. Marsh, E. Henderson, Colloidal Gold Particles as an Incompressible Atomic Force Microscope Imaging Standard for Assessing the Compressibility of Biomolecules, *Biophysical Journal* (1993) 992–997.
- [121] D. Fotiadis, Imaging and manipulation of biological structures with the AFM, *Micron* 33 (2002) 385–397.
- [122] M. Kolari, *Attachment mechanisms and properties of bacterial biofilms on non-living surfaces*. Dissertation, 2003.
- [123] W. Han, J. Mou, J. Sheng, J. Yang, Z. Shao, Cryo-Atomic Force Microscopy: a new approach for biological imaging at high resolution, *Biochemistry* (1995) 8215–8220.
- [124] Q. Zhong, D. Inniss, K. Kjoller, V.B. Elings, Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy, *Surface Science Letters* (1993) 688–692.

7. Literaturverzeichnis

- [125] H. Hertz, Über die Berührung fester elastischer Körper, *Journal für die reine und angewandte Mathematik* (1881) 156–171.
- [126] J.A. Greenwood, Adhesion of elastic spheres, *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 453 (1997) 1277–1297.
- [127] I.N. Sneddon, The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile,, *International Journal of Engineering Science* (1965) 47–57.
- [128] J.D. Ferry, *Viscoelastic properties of polymers*, John Wiley & Sons, New York, 1980.
- [129] J. Stapf, Bestimmung der dynamischen Oberflächenspannung mit Hilfe der Blasendruckmethode. Dissertation, 2010.
- [130] H. Gobrecht, *Lehrbuch der Experimentalphysik/Bergmann Schaefer/Mechanik, Akustik, Wärme*, Walter de Gruyter GmbH & Co.KG, 1990.
- [131] M. Minsky, *MICROSCOPY APPARATUS*, 1957.
- [132] J.B. Pawley, *Handbook of biological confocal microscopy*, 3rd ed., Springer, New York, NY, 2006.
- [133] M. Minsky, Memoir on inventing the confocal scanning microscope, *Scanning* 10 (1988) 128–138.
- [134] O.J. Smirnov, P. Lombardi, G. Ranucci, Precision measurements of time characteristics of ETL9351 photomultipliers, *Instruments and Experimental Techniques* 1 (2004) 69–80.
- [135] W. Becker, B. Su, O. Holub, K. weisshart, FLIM and FCS detection in laser-scanning microscopes: Increased efficiency by GaAsP hybrid detectors, *Microsc. Res. Tech.* (2010) n/a.
- [136] Coates P. B., A theory of afterpulse formation in photomultipliers and the prepulse height distribution, *J. Phys. D: Appl. Phys.* (1973) 1862–1869.
- [137] V.K. Zworykin, G.A. Morton, L. Malter, The Secondary Emission Multiplier-A New Electronic Device, *Proc. IRE* 24 (1936) 351–375.
- [138] Resandt, R. W. W., Marsman, H. J. B., R. Kaplan, J. Davoust, Stelzer, E. H. K., R. Stricker, Optical fluorescence microscopy in three dimensions: microtomoscopy, *Journal of Microscopy* 138 (1985) 29–34.
- [139] K. Carlsson, P.E. Danielsson, R. Lenz, A. Liljeborg, L. Majlöv, N. Alsund, Three-dimensional microscopy using a confocal laser scanning microscope, *Optics Letters* 2 (1985) 53–55.
- [140] H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie. Eine Einführung*, 5th ed., Wiley-VCH, Weinheim, Bergstr, 2013.
- [141] H. Günther, *NMR-Spektroskopie. Grundlagen, Konzepte und Anwendungen der Protonen- und Kohlenstoff-13 Kernresonanz-Spektroskopie*, 3rd ed., Georg Thieme, New York, 1992.
- [142] H. Günther, *NMR spectroscopy. Basic principles, concepts, and applications in chemistry*, 3rd ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2013.
- [143] P. Zeeman, The effect of magnetisation on the nature of light emitted by a substance, *Nature* 1424 (1897) 347.
- [144] S. Braun, H.-O. Kalinowski, S. Berger, *100 and More Basic NMR Experiments: A Practical Course*, Wiley-VCH, Weinheim, 1996.
- [145] M. Hesse, S. Bienz, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. 114 Tabellen*, 8th ed., Thieme, Stuttgart [u.a.], 2012.
- [146] E. Butler, 2003, *Bruker-Beginners Guide*, Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten.

- [147] L. Wolf, H. Hoffmann, J. Linders, C. Mayer, PFG-NMR self diffusion measurements in the single phase channels of a microemulsion system with an anionic-nonionic surfactant mixture, *Soft Matters* (2012) 2731–2739.
- [148] O. Casse, A. Shkilnyy, J. Linders, C. Mayer, D. Häussinger, A. Völkel, A.F. Thünemann, R. Dimova, H. Cölfen, W. Meier, H. Schlaad, A. Taubert, Solution Behavior of Double-Hydrophilic Block Copolymers in Dilute Aqueous Solution, *Macromolecules* 11 (2012) 4772–4777.
- [149] D. Burstein, Stimulated Echoes: Description, Applications, Practical Hints, Concepts in *Magnetic Resonance* 4 (1996) 269–278.
- [150] K. Dunkhorst, Diffusionsmessungen an Polyethylenglykolen mittels PFG-NMR-Spektroskopie und dynamische Lichtstreuung. Dissertation, 2004.
- [151] E.L. Hahn, Spin Echoes, *Phys. Rev.* 80 (1950) 580–594.
- [152] C.S. Johnson, Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 34 (1999) 203–256.
- [153] R. Kerssebaum, G. Salnikov, 2006, DOSY and Diffusion by NMR-A Tutorial for TopSpin 2.0, Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten.
- [154] J. Kärger, NMR self-diffusion studies in heterogeneous systems, *Advances in Colloid and Interface Science* 0 (1985) 129–148.
- [155] J. Kärger, H. Pfeifer, W. Heink, Principles and applications of self-diffusion measurements by nuclear magnetic resonance. In: Waugh, J. S. (ed.), *Advances in Magnetic Resonance*, Academic Press, 1988.
- [156] J. Kärger, D.M. Ruthven, D.N. Theodorou, *Diffusion in nanoporous materials*, Wiley-VCH, Weinheim, 2012.
- [157] J.E. Tanner, E.O. Stejskal, Restricted self-diffusion of Protons in colloidal systems by the pulsed-gradient, spin-echo method, *The Journal of Chemical Physics* 4 (1968) 1768–1777.
- [158] E.O. Stejskal, Use of Spin Echoes in a Pulsed Magnetic-Field Gradient to Study Anisotropic, Restricted Diffusion and Flow, *The Journal of Chemical Physics* 10 (1965) 3597–3603.
- [159] F.C. Ruhnau, *¹H/¹³C/¹⁴N-Triple-Resonanz Festkörper-NMR-Untersuchungen an Polymeren und Polymermischungen*, Shaker, Aachen, 1997.
- [160] R. Schreiber, Untersuchung der Einflüsse von Spinnengeschwindigkeit und Streckgrad auf Struktur und Orientierung von Nylon-6 Fasern mit Hilfe der Festkörper-NMR-Spektroskopie. Dissertation, 2000.
- [161] J. Schaefer, E.O. Stejskal, Carbon-13 nuclear magnetic resonance of polymers spinning at the magic angle, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 1031–1032.
- [162] A.L. Bloom, J.N. Shoolery, Effects of Perturbing Radiofrequency Fields on Nuclear Spin Coupling, *Phys. Rev.* 97 (1955) 1261–1265.
- [163] A. Pines, Proton-enhanced NMR of dilute spins in solids, *J. Chem. Phys.* 59 (1973) 569.
- [164] H. Saitô, I. Ando, A. Naito, *Solid state NMR spectroscopy for biopolymers. Principles and applications*, Springer, Dordrecht, 2006.
- [165] W.S. Veeman, *Carbon-13 Shift Anisotropy Progress in NMR Spectroscopy*, Pergamon Press, London, 1984.
- [166] E.R. ANDREW, A. BRADBURY, R.G. EADES, Nuclear Magnetic Resonance Spectra from a Crystal rotated at High Speed, *Nature* 182 (1958) 1659.
- [167] R.O. Wayne, *Light and Video Microscopy*, Academic Press, 2009.

7. Literaturverzeichnis

- [168] J. Tyndall, Six Lectures on Light: Delivered in America in 1872-1873, Longmans Green And Co., London, 1895.
- [169] S. Beuermann, Präparation von elektrisch geladenen Polyalkylcyanoacrylat-Nanokapseln zur elektrophoretischen Abscheidung an Oberflächen. Diplomarbeit, 2006.
- [170] E. Abbe, Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung, Archiv für mikroskopische Anatomie 1 (1873) 413–418.
- [171] C. Finder, Wohlgemuth, M. Mayer, C., Analysis of Particle Size Distribution by Particle Tracking, Part. Part. Syst. Charact. 21 (2004) 372–378.
- [172] R. Brown, A brief account of microscopical observations made in the months of June, July and August, 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies, The miscellaneous botanical works (1827).
- [173] A. Einstein, Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen, Ann. Phys. 322 (1905) 549–560.
- [174] M. Smoluchowski, Zur kinetischen Theorie der Brownschen Molekularbewegung und der Suspensionen, Ann. Phys. 326 (1906) 756–780.
- [175] H.-J. Butt, K. Graf, M. Kappl, Physics and chemistry of interfaces, 2nd ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2006.
- [176] O. Stern, Zur Theorie der elektrolytischen Doppelschicht, Zeitschrift für Elektrochemie und angewandte physikalische Chemie 21 (1924) 508–516.
- [177] H. Helmholtz, Ueber einige Gesetze der Vertheilung elektrischer Ströme in körperlichen Leitern mit Anwendung auf die thierisch-elektrischen Versuche, Annalen der Physik und Chemie 165 (1853) 211–233.
- [178] H. Helmholtz, Studien über electrische Grenzschichten, Ann. Phys. Chem. 243 (1879) 337–382.
- [179] D.L. Chapman, LI. A contribution to the theory of electrocapillarity, Philosophical Magazine Series 6 25 (1913) 475–481.
- [180] P.C. Hiemenz, Principles of colloid and surface chemistry, M. Dekker, New York, 1977.
- [181] M.P. Hofmann, Physikalische Charakterisierung von Calciumphosphat-Pulvern zur Einstellung von Prozessparametern für die Herstellung von Knochenzement. Dissertation, 2003.
- [182] Villanueva Garibay, J. A., F. Moegle-Hofacker, K. Müller, Simulation of Spin Relaxation and Chemical Exchange in Solid-State NMR. Book of Abstracts, 2010.
- [183] K. Mueller, Spin relaxation in isolated and coupled non-integer quadrupolar nuclei: Theory and application for $I=3/2$ nuclei Presented at the annual meeting of the Deutsche Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie, Potsdam, Germany, May 9,11, 2002, Phys. Chem. Chem. Phys. 4 (2002) 5515–5523.
- [184] R.R. Vold, Deuterium NMR Studies of Dynamics in Solids and Liquid Crystals. In: Tycko, R. (ed.), Nuclear Magnetic Resonance Probes of Molecular Dynamics, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1994.
- [185] C. Mayer, Lineshape calculations on spreadsheet software, Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997) 138 (1999) 1–11.
- [186] C. Mayer, Calculation of MAS spectra influenced by slow molecular tumbling, Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997) 139 (1999) 132–138.

- [187] K. Müller, K.-H. Wassmer, G. Kothe, Dynamic Magnetic Resonance of Liquid Crystal Polymers: Molecular Organization and Macroscopic Properties, *Adv. Polym. Sci.* (1990) 1–55.
- [188] J. Stohrer, G. Gröbner, D. Reimer, K. Weisz, C. Mayer, G. Kothe, Collective lipid motions in bilayer membranes studied by transverse deuteron spin relaxation, *J. Chem. Phys.* (1991) 672–678.
- [189] T.M. Bayerl, Collective membrane motions, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* (2000) 232–236.
- [190] G. Skjak-Braek, S. Paoletti, T. Gianferrara, Selective Acetylation of Mannuronic Acid in Calcium ALfinate Gels, *Carbohydrate Research* (1989) 119–129.
- [191] S. Hestrin, The Reaction of Acetylcholine and other Carboxylic Acid Derivates with Hydroxylamine, and its Analytical Application, *J. Biol. Chem.* (1949) 249–261.
- [192] F. Feigl, V. Anger, O. Frehden, Über die Verwendung von Tüpfelreaktionen zum Nachweis organischer Verbindungen. (I.), *Mikrochemie 1* (1934) 1–8.
- [193] http://www.heipha.de/files/product/de/0177e-2-0210_R2A-Agar-chromogen.pdf. Aufgerufen am 12.05.2015 um 13.50 MEZ.
- [194] van der Linde, K., Improved bacteriological surveillance of haemodialysis fluids: a comparison between Tryptic soy agar and Reasoner's 2A media, *Nephrology Dialysis Transplantation* 14 (1999) 2433–2437.
- [195] W.P. Aue, Heteronukleare J-Skalierung mit Multipulssequenzen und 2D J Aufgelöste Spektroskopie. Dissertation, 1979.
- [196] S. Hesse, NMR-Untersuchungen der Struktur von Cellulosen und Biopolymeren. Diplomarbeit, 1998.
- [197] M.T. Saner, ¹³C-Magnetresonanz-Spektroskopie: Methoden zur Sensitivitätssteigerung und Volumenselektion auf einem Ganzkörpergerät. Dissertation, 1991.
- [198] A. Werner, Zur Theorie der Beizenfarbstoffe, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 1* (1908) 1062–1071.
- [199] M. Chai, J. Cepela, O-Acetylation and water retention of alginates, *The 227th ACS National Meeting* (2004).
- [200] P. Tielen, M. Strathmann, K.-E. Jaeger, H.-C. Flemming, J. Wingender, Alginate acetylation influences initial surface colonization by mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiological research* 160 (2005) 165–176.
- [201] M. Vogt, Wasserdiffusion in Biofilmen von *Pseudomonas Aeruginosa* und Polysaccharid/Wasser-Systemen: Eine PFG-NMR Untersuchung. Dissertation, 2001.
- [202] R. Mills, Self-Diffusion in Normal and Heavy Water in the Range 1–45°, *The Journal of Physical Chemistry* 5 (1973) 685–688.
- [203] J.G. Leid, C.J. Willson, M.E. Shirtliff, D.J. Hassett, M.R. Parsek, A.K. Jeffers, The Exopolysaccharide Alginate Protects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Bacteria from IFN- γ -Mediated Macrophage Killing, *The Journal of Immunology* 175 (2005) 7512–7518.
- [204] E.H. Hardy, A. Zygar, M.D. Zeidler, M. Holz, F.D. Sacher, Isotope effect on the translational and rotational motion in liquid water and ammonia, *J. Chem. Phys.* 114 (2001) 3174.
- [205] H.-C. Flemming, The perfect slime, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* (2011) 251–259.

7. Literaturverzeichnis

- [206] K. Nakamura, T. Hatakeyama, H. Hatakeyama, Studies on Bound Water of Cellulose by Differential Scanning Calorimetry, Textile Research Institute (1981) 607–613.
- [207] E.B. Roberson, M.K. Firestone, Relationship between Desiccation and Exopolysaccharide Production in a Soil *Pseudomonas* sp., American Society for Microbiology 58 (1992) 1284–1291.
- [208] R.F. Schmidt, F. Lang, M. Heckmann (Eds.), Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie ; mit 85 Tabellen ; mit herausnehmbarem Repetitorium, 31st ed., Springer-Medizin-Verl, Heidelberg, 2010.
- [209] G. Colicchia, A. Künzl, H. Wiesner, DRUCK ATMUNG BLUTKREISLAUF. Lehrvorschrift.
- [210] H. Renz-Polster, S. Aries, Basislehrbuch innere Medizin. Kompakt - greifbar - verständlich, 3rd ed., Elsevier, Urban und Fischer, München, Jena, 2004.
- [211] Z. Lu, X. Zhang, Y. Li, J. Jin, Y. Huang, TLR4 antagonist reduces early-stage atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-deficient mice, Journal of Endocrinology (2013) 61–71.
- [212] C.W. Stevens, S. Aravind, S. Das, R.L. Davis, Pharmacological characterization of LPS and opioid interactions at the toll-like receptor 4, British journal of pharmacology 168 (2013) 1421–1429.
- [213] L. Nierzwicki, M. Wieczor, V. Censi, M. Baginski, L. Calucci, S. Samaritani, J. Czub, C. Forte, Interaction of cisplatin and two potential antitumoral platinum(II) complexes with a model lipid membrane: a combined NMR and MD study, Physical chemistry chemical physics : PCCP 17 (2015) 1458–1468.
- [214] L. Kalie, Einfluss des Serum-Komplementsystems auf die Permeabilität von Liposomenmembranen. Dissertation, 2006.
- [215] A. Bergstrand, C. Svanberg, M. Langton, M. Nydén, Aggregation behavior and size of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O55:B5, Colloids and surfaces. B, Biointerfaces 53 (2006) 9–14.
- [216] J.M. Alam, M. Yamazaki, Spontaneous insertion of lipopolysaccharide into lipid membranes from aqueous solution, Chemistry and physics of lipids (2011) 166–174.
- [217] F.M. Marassi, P.M. Macdonald, Response of the headgroup of phosphatidylglycerol to membrane surface charge as studied by deuterium and phosphorus-31 nuclear magnetic resonance, Biochemistry 30 (1991) 10558–10566. DOI: 10.1021/bi00107a027.
- [218] F. Ciesielski, D.C. Griffin, Rittig, M. Moriyón, I., B.B. Bonev, Interactions of lipopolysaccharide with lipid membranes, raft models - a solid state NMR study, Biochimica et biophysica acta 1828 (2013) 1731–1742.

8. Anhang

Tabelle 13: Auflistung der Selbstdiffusionskoeffizienten der schnellen und langsamen D₂O-Fraktion in verschiedenen Konzentrierten Algenalginatgelen.

Massenanteil an D ₂ O	Selbstdiffusionskoeffizient der schnellen D ₂ O-Fraktion [m ² s ⁻¹]	Selbstdiffusionskoeffizient der langsamen D ₂ O-Fraktion [m ² s ⁻¹]
0.5	$3.28 \cdot 10^{-10}$	-
1	$8.87 \cdot 10^{-10}$	$1.11 \cdot 10^{-10}$
2	$1.08 \cdot 10^{-9}$	$1.10 \cdot 10^{-10}$
5	$1.40 \cdot 10^{-9}$	$1.23 \cdot 10^{-10}$
10	$1.57 \cdot 10^{-9}$	$1.19 \cdot 10^{-10}$

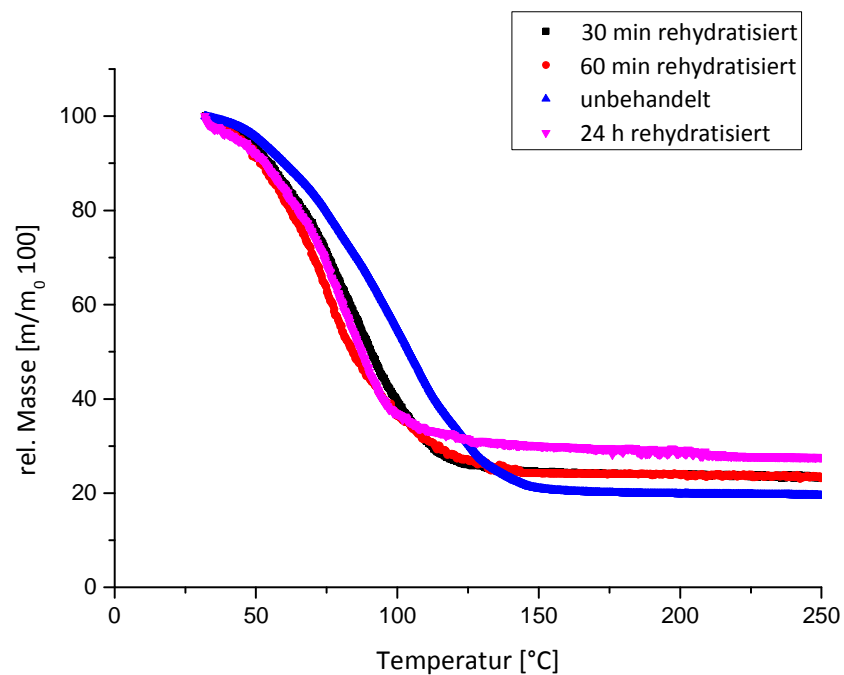


Abbildung 81: Vergleich der Thermogramme verschiedener Rehydratisierungszeiten eines getrockneten Biofilms mit physiologischem Wasser.

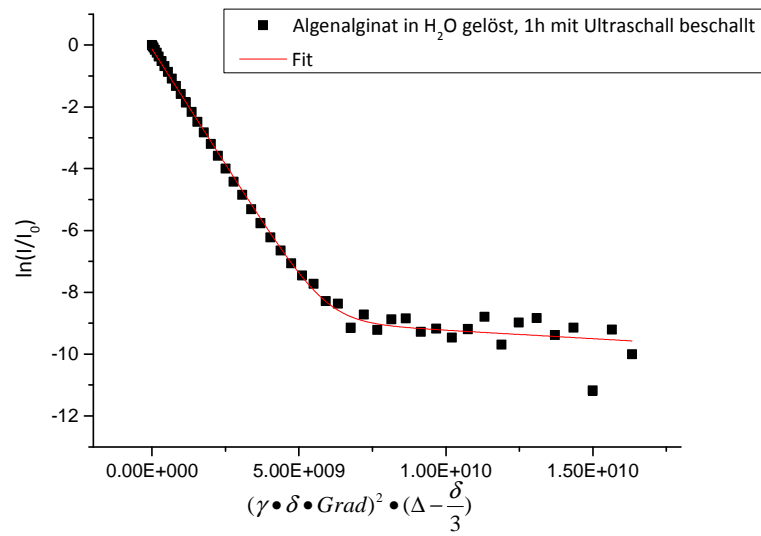


Abbildung 82: Darstellung des Stejskal-Tanner-Auftragungen der ²H-PFG-NMR eines Algnealginates, welches 1 h mit dem Ultraschallfinger beschallt wurde.

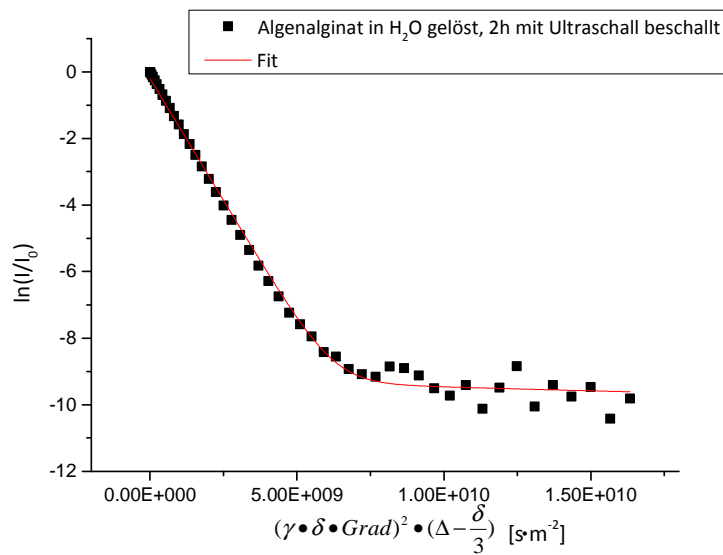


Abbildung 83: Darstellung des Stejskal-Tanner- Auftragungen der ²H-PFG-NMR eines Algnealginates, welches 2 h mit dem Ultraschallfinger beschallt wurde.

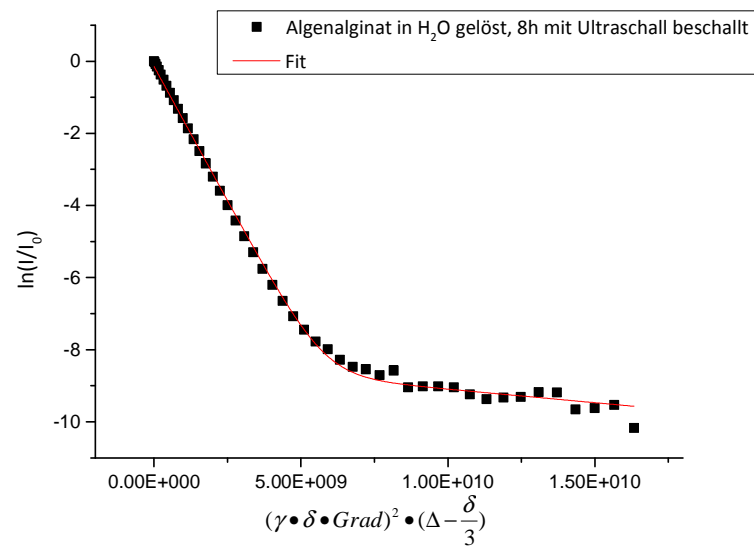


Abbildung 84: Darstellung des Stejskal-Tanner- Auftragungen der ²H-PFG-NMR eines Alginealginates, welches 8 h mit dem Ultraschallfinger beschallt wurde.

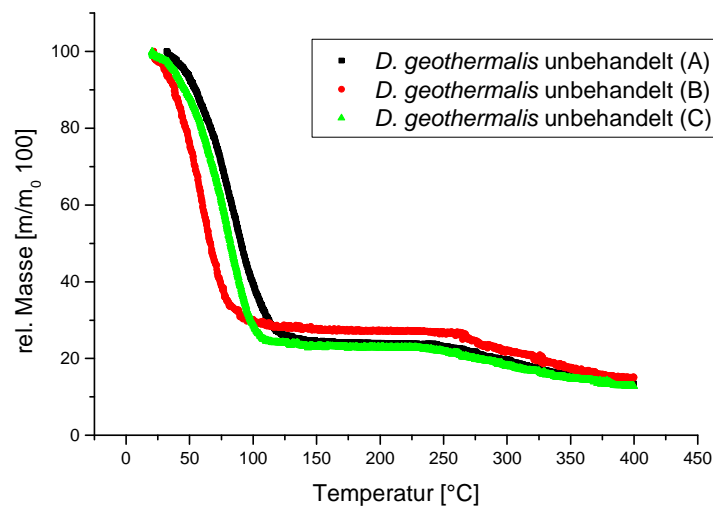


Abbildung 85: Darstellung der TGA-Messungen von *D. geothermalis* als Blindprobe.

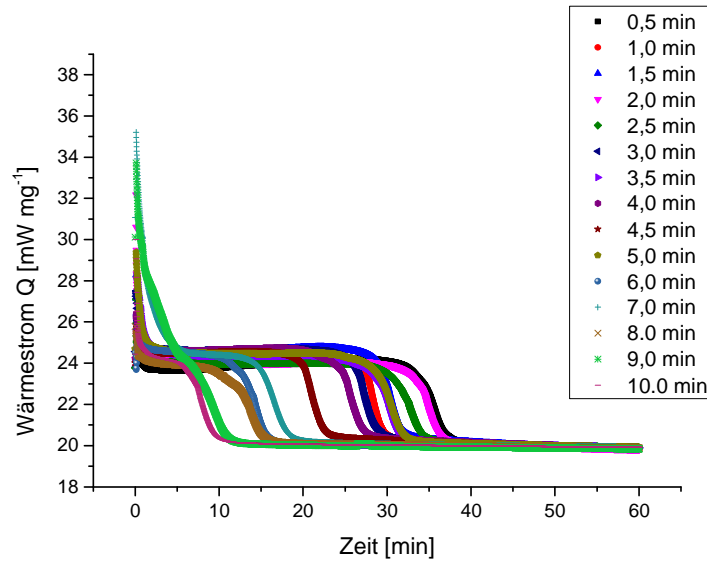


Abbildung 86: Darstellung des Wärmestroms der isothermalen DSC-Messungen eines Biofilms von *D. geothermalis* auf Cellulosefilter bei unterschiedlichen Vortrocknungszeiten in der Trocknungskammer bei 30 °C und einem Stickstoffstrom von 125 mL·min⁻¹.

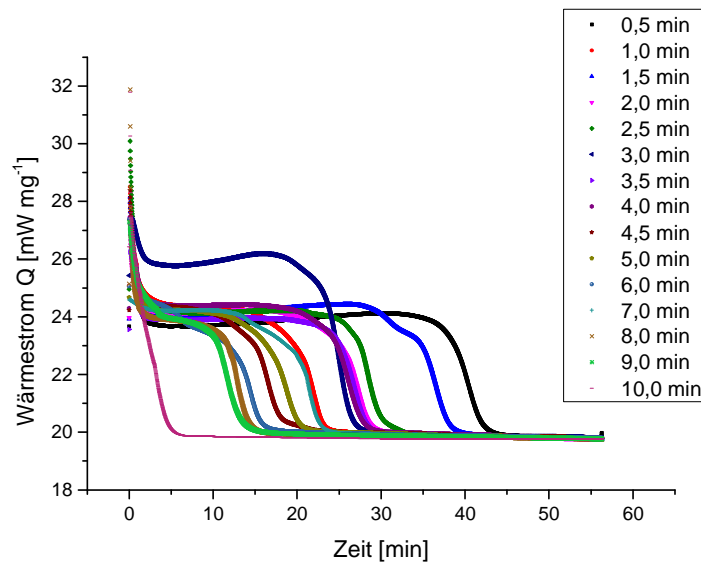


Abbildung 87: Darstellung des Wärmestroms der isothermalen DSC-Messungen eines Biofilms von *D. geothermalis* auf Cellulosefilter bei unterschiedlichen Vortrocknungszeiten in der Trocknungskammer bei 30 °C und einem Stickstoffstrom von 250 mL·min⁻¹.

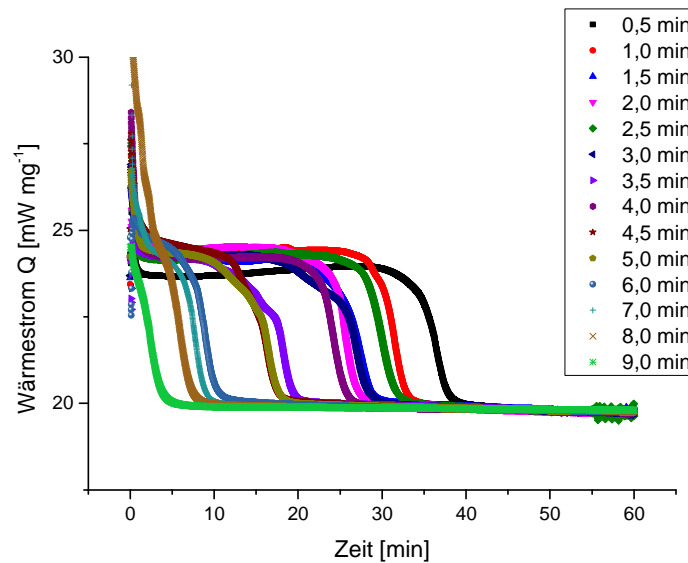


Abbildung 88: Darstellung des Wärmestroms der isothermalen DSC-Messungen eines Biofilms von *D. geothermalis* auf Cellulosefilter bei unterschiedlichen Vortrocknungszeiten in der Trocknungskammer bei 30 °C und einem Stickstoffstrom von 500 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

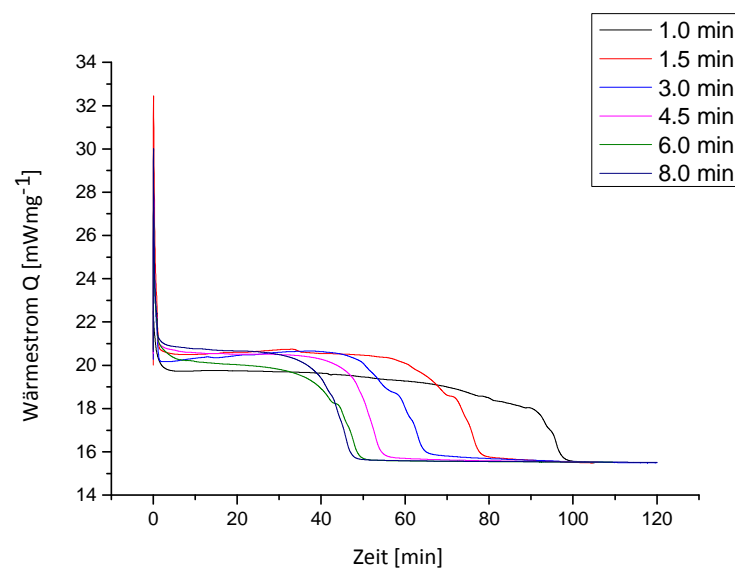


Abbildung 89: Darstellung des Wärmestroms der isothermalen DSC-Messungen eines rehydratisierten Biofilms von *D. geothermalis* auf Cellulosefilter bei unterschiedlichen Vortrocknungszeiten in der Trocknungskammer bei 30 °C und einem Stickstoffstrom von 125 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

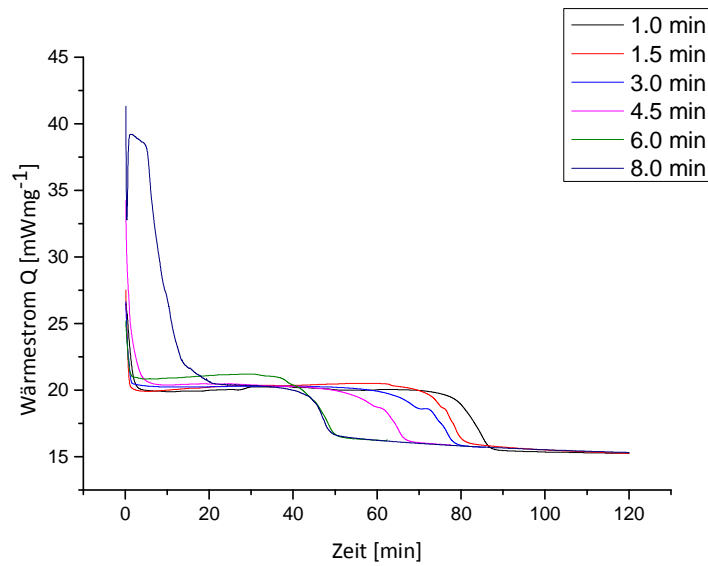


Abbildung 90: Darstellung des Wärmestroms der isothermalen DSC-Messungen eines rehydratisierten Biofilms von *D. geothermalis* auf Cellulosefilter bei unterschiedlichen Vortrocknungszeiten in der Trocknungskammer bei 30 °C und einem Stickstoffstrom von 250 mL·min⁻¹.

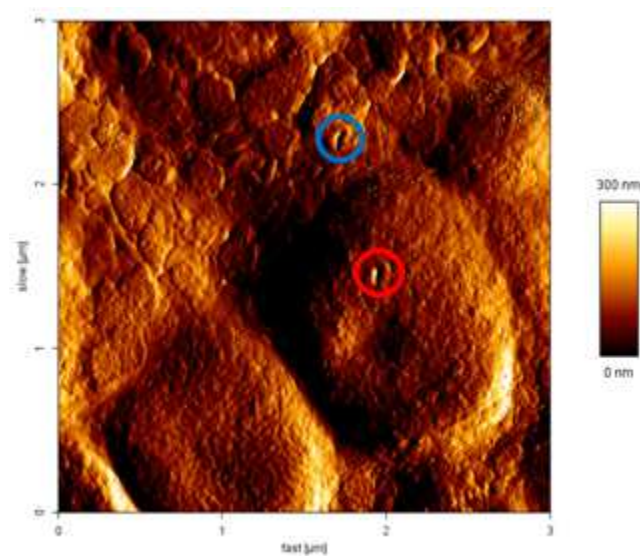


Abbildung 91: Darstellung einer AFM-Aufnahme des Bakteriums *D. geothermalis* 0 min getrocknet. Mit den Kreisen sind die Einstichstellen der AFM-Spitze in die Zelle (rot) und in die EPS (blau) für die Nanoindentationsversuche verdeutlicht.

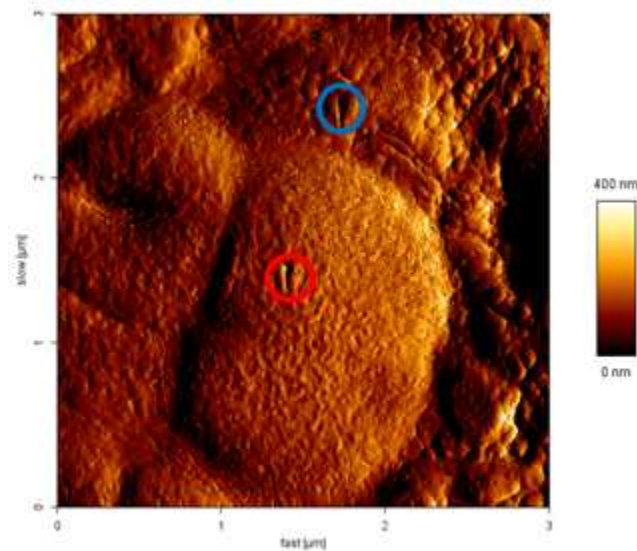


Abbildung 92: Darstellung einer AFM-Aufnahme des Bakteriums *D. geothermalis* 10 min getrocknet. Mit den Kreisen sind die Einstichstellen der AFM-Spitze in die Zelle (rot) und in die EPS (blau) für die Nanoindentationsversuche verdeutlicht.

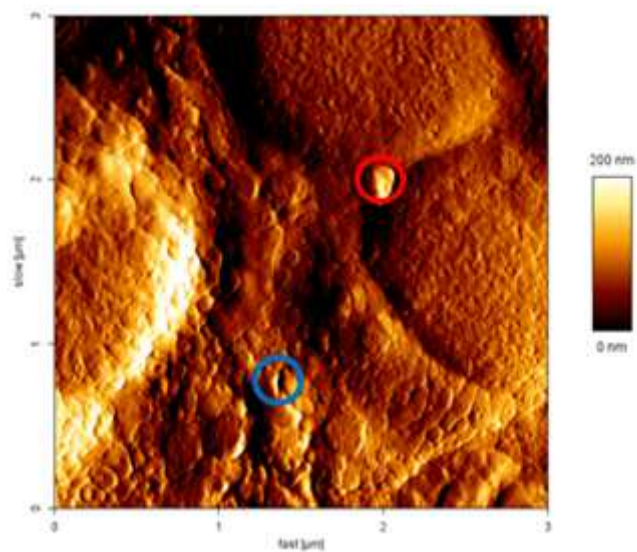


Abbildung 93: Darstellung einer AFM-Aufnahme des Bakteriums *D. geothermalis* 20 min getrocknet. Mit den Kreisen sind die Einstichstellen der AFM-Spitze in die Zelle (rot) und in die EPS (blau) für die Nanoindentationsversuche verdeutlicht.

8. Anhang

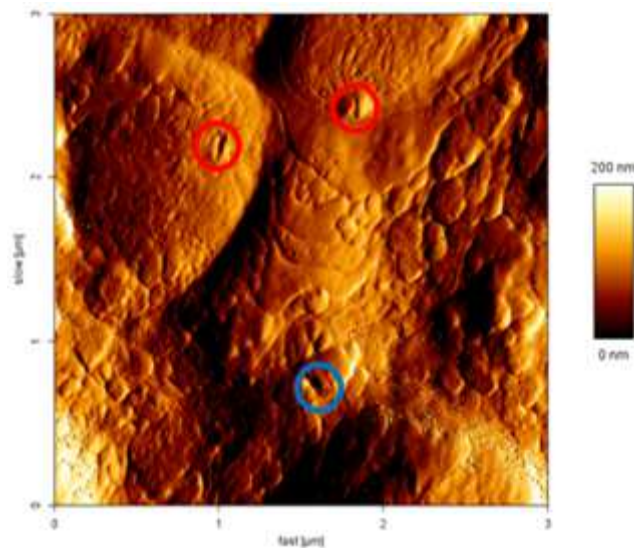


Abbildung 94: Darstellung einer AFM-Aufnahme des Bakteriums *D. geothermalis* 50 min getrocknet. Mit den Kreisen sind die Einstichstellen der AFM-Spitze in die Zelle (rot) und in die EPS (blau) für die Nanoindentationsversuche verdeutlicht.

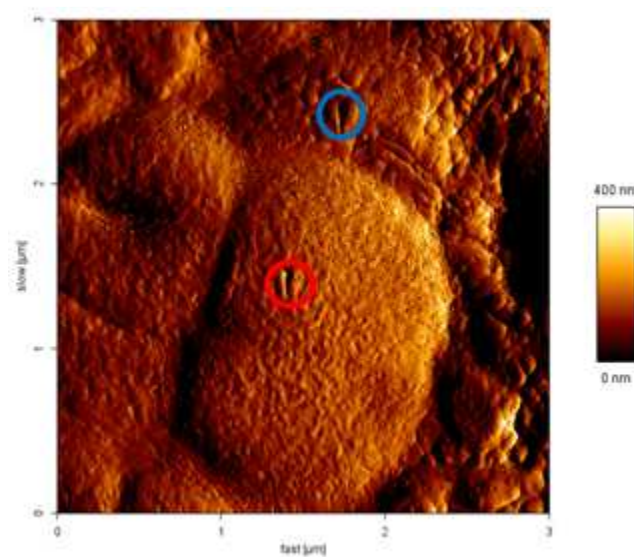


Abbildung 95: Darstellung einer AFM-Aufnahme des Bakteriums *D. geothermalis* 100 min getrocknet. Mit den Kreisen sind die Einstichstellen der AFM-Spitze in die Zelle (rot) und in die EPS (blau) für die Nanoindentationsversuche verdeutlicht.

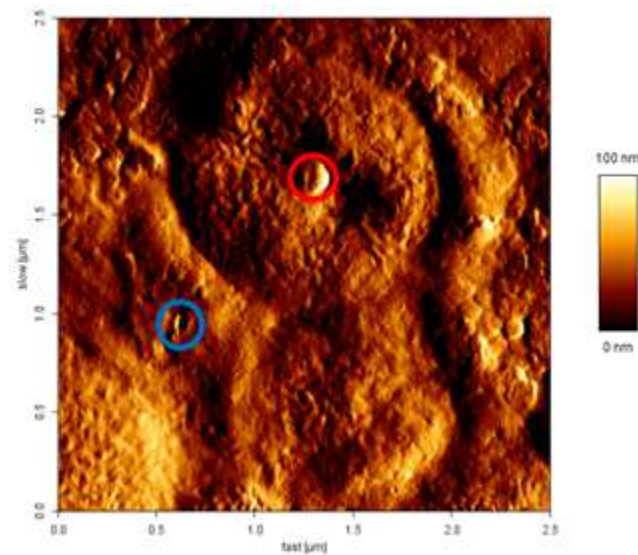


Abbildung 96: Darstellung einer AFM-Aufnahme des Bakteriums *D. geothermalis* 100 min getrocknet. Mit den Kreisen sind die Einstichstellen der AFM-Spitze in die Zelle (rot) und in die EPS (blau) für die Nanoindentationsversuche verdeutlicht.

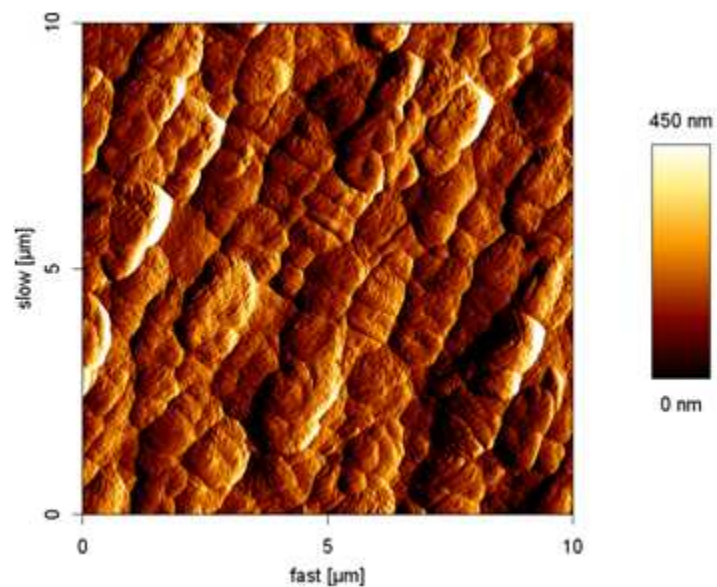


Abbildung 97: Darstellung einer 30 min rehydratisierten Probe des Bakteriums *D. geothermalis*.

8. Anhang

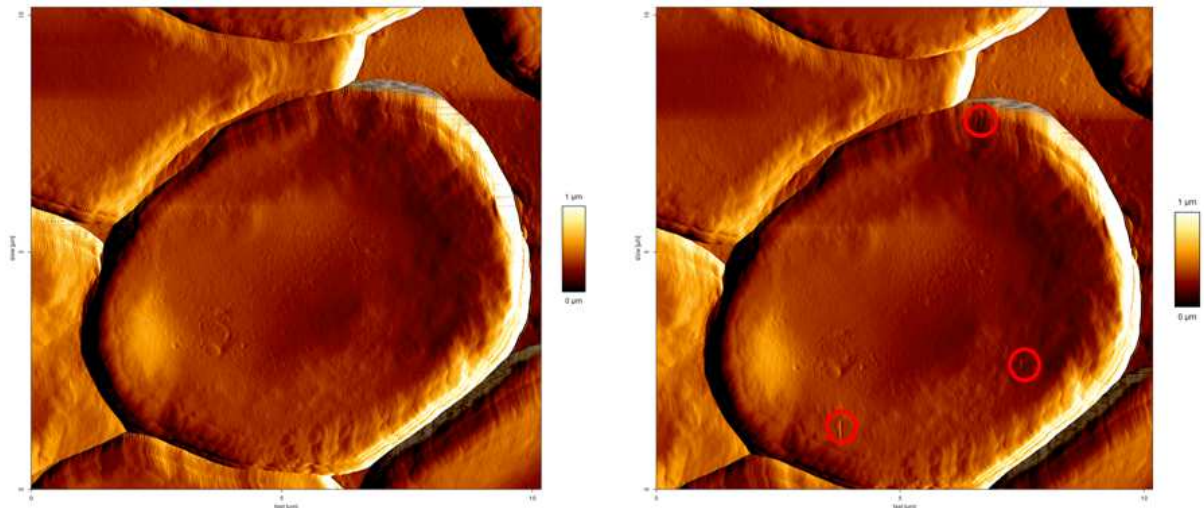


Abbildung 98: Vergleich zweier AFM-Aufnahmen von unbehandelten menschlichen Erythrozyten. Auf der linken Seite ist ein rotes Blutkörperchen vor dem Nanoindentationsversuch zu sehen, und auf der rechten Seite nach dem Einstechen mit der AFM-Spitze. Die Einstichstellen sind mit den roten Kreisen markiert.

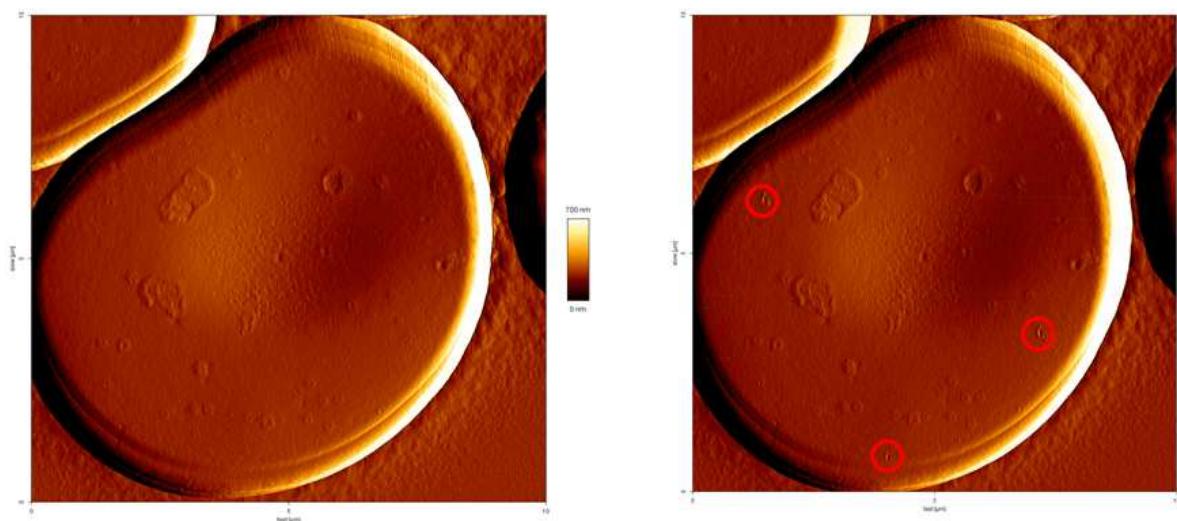


Abbildung 99: Vergleich zweier AFM-Aufnahmen von menschlichen Erythrozyten mit LPS *E. coli* versetzt. Auf der linken Seite ist ein rotes Blutkörperchen vor dem Nanoindentationsversuch zu sehen, und auf der rechten Seite nach dem Einstechen mit der AFM-Spitze. Die Einstichstellen sind mit den roten Kreisen markiert.

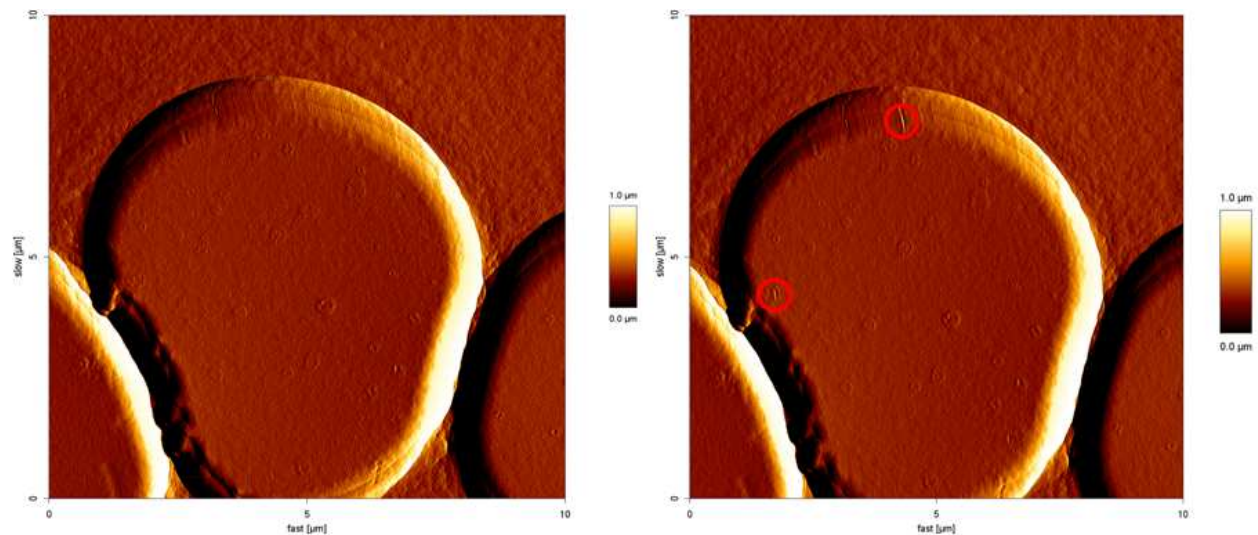


Abbildung 100: Vergleich zweier AFM-Aufnahmen von menschlichen Erythrozyten mit LPS-RS versetzt. Auf der linken Seite ist ein rotes Blutkörperchen vor dem Nanoindentationsversuch zu sehen, und auf der rechten Seite nach dem Einstechen mit der AFM-Spitze. Die Einstichstellen sind mit den roten Kreisen markiert.

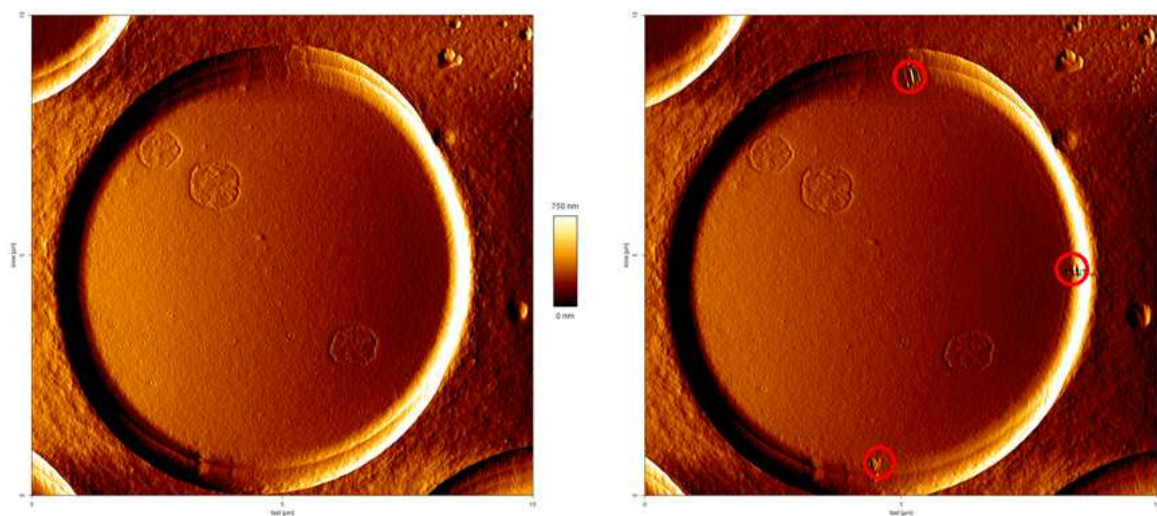


Abbildung 101: Vergleich zweier AFM-Aufnahmen von menschlichen Erythrozyten mit LPS E. coli und LPS-RS versetzt. Auf der linken Seite ist ein rotes Blutkörperchen vor dem Nanoindentationsversuch zu sehen, und auf der rechten Seite nach dem Einstechen mit der AFM-Spitze. Die Einstichstellen sind mit den roten Kreisen markiert.

8. Anhang

Tabelle 14: Auflistung der Zeta-Potentialwerte von DMPC-MLV mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen. Gemessen bei einem pH-Wert von 10 und 295 K.

LPS-Konzantration [mol-%]	Zeta-Potantial [mV]
0	-15.2 \pm 0.5
0.23	-17 \pm 0.8
2.5	-23 \pm 0.6

ABKÜRZUNGS- UND SYMBOLVERZEICHNIS

A	Fläche
A_1	Gewichtungsfaktor der schnellen D ₂ O-Fraktion
A_2	Gewichtungsfaktor der langsamen D ₂ O-Fraktion
AFM	Rasterkraftmikroskopie (engl. atomic force microscopy)
A_K	Oberfläche einer Kugel
B_0	Magnetfeld
°C	Grad Celsius
c	Konzentration
CLSM	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (engl. confocal laser scanning microscopy)
CMC	kritische Mizellenbildungskonzentration (engl. critical micelle concentration)
CP	Kreupolarisation (engl. cross polarization)
C_{pr}	Wärmekapazität der Probe
C_r	Wärmekapazität der Referenzprobe
CRT	Kathodenstrahlröhre (engl. cathode ray tube)
D	Diffusionskoeffizient
Δ	Diffusionszeit
Δ_v	lineare Verschiebung
δ	Eindringtiefe
	Gradientenlänge
d	Schichtdicke
d_{AK}	Oberflächenveränderung einer Kugel
d_{VK}	Volumenveränderung einer Kugel
dW_{AK}	Arbeit die notwendig ist um die Kugeloberfläche zu verändern
dW_{VK}	Arbeit die notwendig ist um das Kugelvolumen zu verändern
<i>D. geothermalis</i>	<i>Deinococcus geothermalis</i>
d_H	hydrodynamischer Durchmesser

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

DMPC	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DSC	Differenzscanning Kalorimetrie (engl. differential scanning calorimetry)
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
E	Elastizitätskoeffizient
ϵ	Extinktionskoeffizient
ϵ_0	Influenzkonstante
ϵ_r	Dielektrizitätszahl
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E_{pot}	Potentielle Energie
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
F	Kraft
$F(h)$	Kraft des Hook'schen Gesetztes
$f(Kr)$	Korrekturfunktion
FID	engl. free induction decay
FT	Fourier Transformation
Γ	Bewegungsmatrix
γ	Oberflächenspannung
grad c	Gradient der Stoffmengenkonzentration
GPC	Gelpermeations Chromatographie
G_{max}	maximale Gradientenstärke
G_x	Feldstärke des Gradientenfeldes am Ort x
\hat{H}	Hamilton-Operator
h	Plancksches Wirkungsquantum
\hbar	reduziertes Plancksches Wirkungsquantum
$\Delta H_{m,v}$	molare Verdampfungsenthalpie
$\Delta_R H^\circ_n$	molare Standardreaktionsenthalpie

I	beobachtete Intensität im Spektrum
I_0	Intensität des eingestrahnten Lichtes
I_1	Intensität des transmittierenden Lichtes
IEP	Isoelektrischer Punkt
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
ISC	engl. intersystem crossing
J	Teilchenstromdichte
K	Gleichgewichtskonstante
k	Federkonstante
k_B	Boltzmannkonstante
KDO	2-Keto-3-deoxyoctan
kHz	Kilohertz
λ	Wellenlänge
LPS	Lipopolysaccharid
LPS-RS	Lipopolysaccharid vom Bakterium <i>Rhodobacter sphaeroides</i>
M_0	makroskopische Magnetisierung
m%	Massenprozent
MAS	engl. magic angle spinning
μE	elektrophoretische Beweglichkeit
mg	Milligramm
m_I	magnetische Spinquantenzahl
min	Minute
mL	Milliliter
μL	Mikroliter
MLV	multilamellare Vesikel
mm	Millimeter
μm	Mikrometer

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

M_y	makroskopische Magnetisierung in y-Richtung
n	Teilchenzahl
η	dynamische Viskosität
N_A	Avogadro-Zahl
N_R	Partikelanzahl rechts
N_L	Partikelanzahl links
NF- κ B	Kern Faktor-Kappa B
Nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanz (engl. nuclear magnetic resonance)
Θ	Impulswinkel
P	Drehimpuls
p	Druck
P_1	Selbstdiffusionskoeffizient der schnellen D ₂ O-Fraktion
P_2	Selbstdiffusionskoeffizient der langsamen D ₂ O-Fraktion
p. A.	pro analysi
PFG	gepulste Feldgradienten NMR (engl. pulsed field gradient)
p_{ober}	Oberflächendruck
ppm	parts per million
P_z	Drehimpuls
q	Wärmemenge
R	ideale Gaskonstante
\Re	Reibungskoeffizient nach Stokes
R2A	Agar-Typ R2A
RF	Radiofrequenz
r_H	hydrodynamischer Radius
S	Entropie
s	Sekunde
SMILED	Simulation of Motional Influence, Lineshape effects, chemical Exchange and Dynamics

T	absolute Temperatur
t	Zeit
τ	Impulslänge
$\tan(\alpha)$	halber Öffnungswinkel der AFM-Spitze
TGA	thermogravimetrische Analyse
TLR-4	Toll-Like-Rezeptor-4
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
U	innere Energie
ULV	unilamellare Vesikel
UV	ultraviolett
V	Volumen
v	Geschwindigkeit
ν	Poissonzahl
ν_L	Lamorfrequenz
Δv	mittlere lineare Verschiebung
V(r)	potentielle Energie
V_K	Volumen einer Kugel
ω_{MAS}	Winkelfrequenz in MAS
ζ	Zeta-Potential

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.